الجمهـــوريـــة العـــربيـــة الســـوريـــة
وزارة التعـــليـــم العـــالـــي
جامعة دمشـــق - كلية الزراعة
قسم علوم البستنة

الإكثار الخضري الدقيق والتحليل الكيميائي لبعض أنواع السوسن البري في سورية

In vitro micropropagation and chemical analysis of some wild *Iris* species in Syria

رســالـــة أعــدت لنيــل درجـــة الماجســتير في الهـــندســـة الـــزراعـــية

إعـــداد
م. ثريا طانوس أبو زيدان

إشـــراف

المشـــرف المشارك
الأستاذ الدكتور نبيل البطل
كلــية الزراعـــة – جامعـــة دمشـــق

المشـــرف
الأستاذ الدكتور خليل المعري
كلــية الزراعـــة – جامعـــة دمشـــق

٢٠١١/١٢/٢٨ م

شكر و تقدير Acknowledgement

إلى كل من أضاء بعلمه عقل غيره

أو هدى بالجواب الصحيح حيرة سائليه

فأظهر بسماحته تواضع العلماء

وبرحابته سماحة العارفين

أحياناً تعجز الكلمات عما يجول في خاطر المرء من شكر وتقدير، وخاصةً لمن قـدموا عصـارة قلوبهم، ونتاج جهدهم الطويل، و تجربتهم المريرة، فكل الشكر والتقدير لأساتذتنا الأفاضل........

واليوم لا يسعني سوى أن أقف وقفة احترام وتقدير للأيادي التي أعطتني زاداً أشـق بـه طريـق الحياة وأخص بالشكر **الأستاذ الدكتور خليل وجيه المعري والأستاذ الدكتور نبيل البطل،** اللـذين تفضلا مشكورين بالإشراف على هذه الرسالة فلهما خالص الشكر والعرفان .

كما أتقدم بجزيل الشكر والامتنان لأعضاء لجنة الحكم: **الأستاذ الدكتور خليل المعري، و الدكتورة رولا بايرلي ، والدكتورة راما عزيز.** ولجميع أعضاء الهيئة التدريسية، لتلك الأيادي التـي تنشـر النور والمعرفة.

الإهداء

إلى مَن علّمني كَيف الصعود و حَمل لي شُعلةً

تلذذ بحروقاتِها في يَديهِ لينيرَ لي دَربي

إلى ذاك الرَجل الذي عَلَمني العِزّة و كحّل عينيّ بالكِبرياء

إلى ذاكَ الذي ما زالَت عينيه تَصنعني طِفلة حَتّى اللحظة !.

والدي العزيز

إلى نور حياتي و ملاذي الأوحد

إلى جمال الوجود و نور السماء

إلى من أرضعتني الحب والحنان

إلى رمز الحب و بلسم الشفاء

إلى القلب الناصع البياض

أمي الحبيبة

إلى سندي و قوتي وملاذي

إلى من آثروني على أنفسهم

إلى من أظهروا لي ما هو أجمل من الحياة

و تَقاسموا مَعي ظلمَة ليلِ واحِدة

إخوتي

إلى روحي و قلبي

إلى ملاكي وحبي الأبدي

لِمن أمسك بِيدي و كانَ عَوني و سَندي

لِمن أبى إلا أنْ أكونَ هُنا رَغماً عَن أنفِ الحَياة

لكفّه البيضاء و روحِه الجميلة شَريك حَياتي

زوجي الحبيب

إلى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة

إلى رياحين حياتي

أبناء أختي عازر وسمير

إلى فرح الشمس في ثوب الغروب

إلى ورود أيامي والفجر الذي لم يولد بعد

إلى الذين لا تحلو الضحكة إلا معهم

و لا تكتمل دائرة الحياة إلا بهم

أصدقائي

كان بودي أن أهدي كل من تمنوا لي النجاح والتوفيق

و كلّ مَن سَبقني الطَريق و سيلحَقني إليها مِن طلاّب عِلم

لكم جَميعا أُهدي سَهري و تَعبي و جَهدي

ثريا طانوس أبو زيدان

فهرس المحتويات

فهرس الجداول

فهرس المخططات والأشكال

الملخص

تتمتع أنواع السوسن البري في سورية بمقومات جمالية خاصة، ولها أهمية في مجال الدراسات التطبيقية للتنوع الإحيائي. يتصف السوسن بصعوبة إنبات بذوره ووجود بعض أنواعه بكميات قليلة في الطبيعة لذلك توجهت الأنظار إلى إكثاره بزراعة الأنسجة النباتية للمحافظة عليه ودراسة إمكانية استثماره كنبات طبي أو تزييني. تم في هذا البحث وضع تقنية للإكثار الخضري الدقيق للسوسن الأسود والذهبي البريان لأول مرة في سورية ودرست بعض العوامل المؤثرة في الإكثار والتجذير، كما تم إجراء بعض التحاليل الكيميائية للزيت بهدف تحديد أهم المركبات الموجودة فيه باستخدام تقنية GC-MS.

زرعت البراعم القمية للريزومات و قواعد الأوراق (بعد تعقيمها بالكلوروكس 3%) في وسط MS مضافا إليه 30غ/ل سكروز و 2 مغ/ل من السيتوكينين بنزيل أمينو بيورين (BAP) بالإضافة إلى 0.2 مغ/ل من أوكسين أندول بيوتريك أسيد (IBA).

أظهرت النتائج بعد شهر من الزراعة الأولية بأن البراعم الريزومية أبدت أفضل استجابة للنمو (٣٥.٧٦%)، وتفوقت معنويا على قواعد الأوراق ، في حين لم يوجد أي فروق معنوية على مستوى الأنواع النباتية.

أما في مرحلة الإكثار والاستطالة فقد تفوق الوسط MS معنويا على وسط Heller في متوسط عدد النموات المتكونة واستطالتها، وحقق استخدام التركيز ٥ مغ/ل من BAP أعلى معدل إكثار (١٣.٦٣ نمو خضري) مع استطالة جيدة للنموات المتكونة (٤.٧٣ سم) في السوسن الأسود ، أما الوسط الأفضل لإكثار السوسن الذهبي كان بإضافة ٣ مغ/ل BAP (٣.٤٣) وتفوق بذلك معنوياً على الشاهد (١.٢٥).

أدى النقل المتكرر للعينات النباتية ولعدة مرات على نفس أوساط الإكثار إلى زيادة عدد النموات المتكونة واستطالتها ، وذلك بالنسبة لنوعي السوسن الذهبي والأسود.

بالنسبة لمرحلة التجذير، تفوق السوسن الأسود معنوياً على السوسن الذهبي في النسبة المئوية للتجذير الذي بلغ (81.72 % و٦٦.٤٤ % على التوالي) ، وكانت أفضل نسبة للتجذير (89.25%) عند استخدام التركيز ٣ مغ/ل من اوكسين IBA.

أما بالنسبة لمتوسط عدد الجذور، لم تسجل أية فروق معنوية بين نوعي السوسن المستخدمين (الأسود و الذهبي)، كما تفوقت المعاملة بالاوكسين IBA بتركيز٣ مغ/ل معنوياً (٣.٥٧ جذر) على الشاهد (١.٠٩ جذر)، بينما تفوق الشاهد معنوياً على باقي المعاملات في متوسط طول الجذور الذي بلغ ٤.٧٧ سم.

بلغت نسبة نجاح عملية التقسية 100% في السوسن الأسود بعد شهر من نقـل النبيتـات إلى الظروف الطبيعية ، بينما تناقصت هذه النسبة إلى ٨٦.٩٥% في السوسن الـذهبي، وقـد زرعت العينات النباتية في البيت البلاستيكي لمتابعة نموها.

تم تحديد ٢٣ مركب موجودة في زيت السوسن الألماني و١٨ في السوسن الأسود و١٩ في السوسن الذهبي، كما بينت النتائج أن أكبر مركب تواجد في الزيت هو حامض الميرستيك (Tetradecanoic acid) وكانت نسبته (٦١.٤٢ و٨٠.٣٣ و٧٠.٦٧ % من الزيت) في كل من السوسن الألماني والأسود والذهبي على التوالي، يليه بعـد ذلـك عـدة مركبـات مثـل Dodecanoic acid ، Decanoic acid ، Hexadecanoic acid methyl ester ، 9-Octadecenoic acid methyl ester .

الفصل الأول: المقدمة

INTRODUCTION

١- المقــدمة Introduction:

١-١- المقدمة التاريخية:

يعــود اســم العائلة السوسنية إلى جنس السوسن *Iris*، والذي يعــد أكبــر جنس معــروف في أوروبا. أطلق هذا الإسم على جنس السوسن منذ عام 1753 م من قبل عالم النبــات الســويدي Carl Linnaeus، كما يعتبر هذا الإسم مشتقا من آلهة اليونان آيريس رسولة الرب، مجسدة بــذلك قوس قزح دور صلة الوصل بين السماء والأرض (Manning, 2004).

ظهر السوسن في البداية في المناطق الشرقية والجنوبيــة الشــرقية لآســيا أثنــاء العصــر الجيولوجي الثالث، ثم امتد هذا الجنس إلى جميع قارات النصف الشــمالي مــن الكــرة الأرضــية باختلاف الشروط البيئية في هذه الأرض الواسعة، فيمكن أن ينمو السوسن بوجود كميات معتدلة من الرطوبة، تربة جافة أو صحراوية، رملية متنقلة أو ساحلية، شديدة الرطوبة، كما يمكــن أن يعــيش في التربة الحامضية أو الكلسية (Radionenko, 1987).

2-1- الموطن الأصلي والإنتشار الجغرافي :

تنتشر الأنواع التابعة للفصيلة السوسنية حول العالم تقريبا، لكن يبقى انتشــارها نــادرا فــي السهول الإستوائية وفي خطوط العرض العليا، كما تتواجد بشكل كبير في جنوب إفريقيــا وخاصــة في المناطق الممطرة من الجزء الجنوبي الغربي، وفي المناطق المعتدلة الجنوبية والوسطى لأميركا (عدة أجناس صغيرة)، ومنطقة البحر الأبيض المتوسط (السوسن و الزعفران).

تشمل الفصيلة السوسنية حوالي 2000 نوع تقريبا تنتمي إلى 65 جنس عالمــــي معتــرف بها، حيث تبين أن أكثر من 38 جنس والتي تمثل نصف هــذه الأنــواع موجــودة فــــي جنــوب إفريقيا، كما تم تسجيل 707 أنواع و27 جــنس فــــي منطقــة (Capefloral region) وحــدها (Goldblatt,2002; Manning, 2004).

تعد المناطق الحارة والمعتدلة من إفريقيا الجنوبية والقارة الأمريكية الموطن الأصلي للجنس *Iris spp*، كما يوجد أنواع تتمركز في حوض البحر الأبيض المتوسط (Goussen,1982).

ينتشــر هــذا الجنس بشكل كبير فــي شمال أميركا ويعــد مــن المكونات الهامة للفلورات الموجودة فــي أجزاء Eurasia (وهــي عبارة عن غطاء قاري يشــكل ١٠.٦% مــــن ســطح الأرض أو ٣٦.٢% من مساحــة اليابســة ويقــع فــي نصف الكرة الأرضي الشمالي والشــرقي) (Goldblatt and Manning, 2008).

يضم الجنس *Iris* حوالي 300 نوع (Evans, 2002)، وتقطن الأنواع التابعة للجــنس *Iris* المناطق المدارية الشمالية من الكرة الأرضية، إلا أن الجنيسات (Subgenus) التابعة لهذا الجــنس

تختلف كثيراً في مناطق توزعها، فبعض هذه الجنيسات تتوافق في توزعها مع مناطق توزع الجنس، بينما في البعض الأخر ينحصر توزعها في مناطق محددة، وتتلاءم الأنواع ضمن الجنيسات في المتطلبات الزراعية العامة.

3-1 الوصف المورفولوجي:

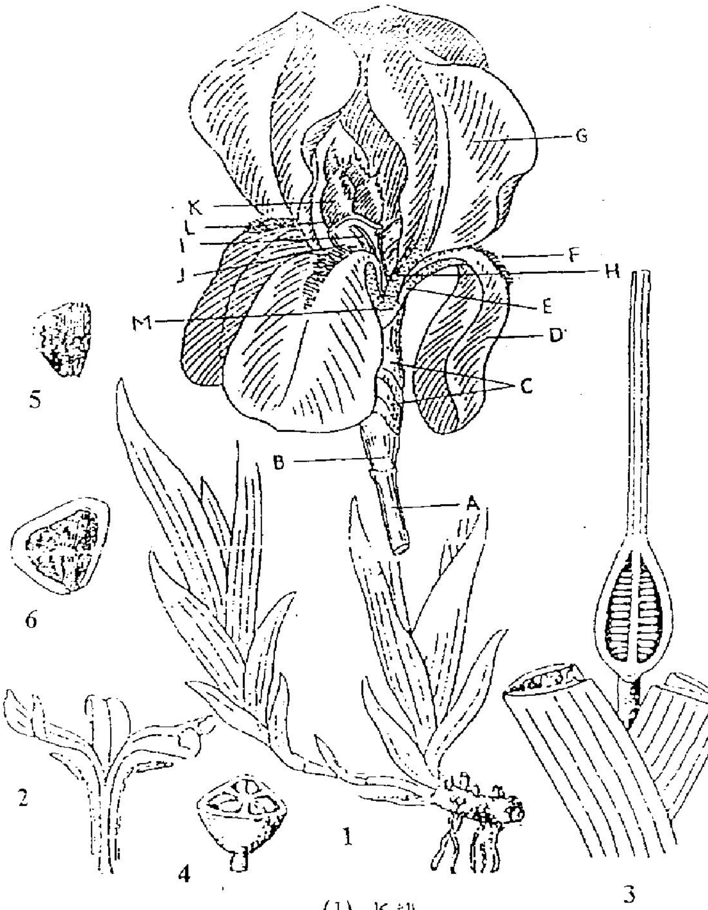
السوسن من النباتات المعمرة طويلة منتصبة واسعة الانتشار وحيدة الفلقة، ريزومية أو بصلية بعضها ستولوني. الأوراق قاعدية مرتبة بصفين متعاكسين (متراكبة) وتتميز بوجود 2-3 أغشية خلوية كما يتجه نصلها بشكل عامودي، له عروق متوازية ويكون إما مرتفعا أو منحنيا (Goldblatt, 2002).

للسوسن سوق زهرية بسيطة أو متفرعة صلبة أو فارغة، الأزهار محمولة على شمراخ زهري يحمل زهرة أو أكثر حسب النوع، وتحمل كل زهرة ضمن قنابتين صغيرتين أو كبيرتين لهما أغشية بشكل جزئي أو كلي، خضراء تشبه الأوراق.

تكون الأزهار متناظرة بشكل شعاعي أو ثنائي ولها ست بتلات، البتلات الخارجية كبيرة، لامعة وفي بعض الأحيان توجد عليها بقع أو خطوط متغيرة قد تكون معطرة، تدوم الأزهار في معظم الأنواع من ٣-٤ أيام (Manning, 2004). تحتوي الزهرة ثلاث أسدية تقع مقابل البتلات الخارجية، والمبيض سفلي له ثلاث حجرات وكل حجرة تحوي العديد من البويضات المرتبطة بالمركز، في بعض الأنواع يكون الجزء العلوي من المبيض عقيم ويشكل منقار ضيق صلب ثلاثي الحجيرات، تتحد البتلات عند القاعدة لتشكل أنبوب زهري يقع فوق المبيض. القلم مقسم من الأعلى إلى ثلاثة أفرع شبه بتلية واضحة . يتألف القرن البذري من ثلاث حجرات تحتوي على بذور كبيرة الحجم (Jayaweer, 1981; Goldblatt, 2002; Manning, 2004).

الثمار عبارة عن كبسولة جافة تتشق طوليا لإخراج البذور ويكون شكلها متغير جدا، البذور كروية إلى خشنة ذات زوايا وغلافها عادة جاف، الإندوسبيرم صلب يحوي احتياطات لمركبات هيميسيللولوزية (زيت وبروتين)، الجنين صغير الحجم (Goldblatt, 2002).

تجمع بين الأنواع التابعة للجنس *Iris* وبين الأنواع التابعة للجنس *Moraea* صفات مشتركة، إلا أن الأخير يتميز بأن أجزاء الغلاف الزهري تتحد إلى أنبوب قصير أو قصير جداً. ويتميز عن الأنواع التابعة للجنس *Gynandriris* بامتلاكه مبيض ثلاثي الحجيرات عوضاً عن المبيض الأحادي الحجيرة في الجنس الأخير (Fred and Chittendeno, 1965). كما هو موضح في الشكل (١).



الشكل (1)

أجزاء نبات السوسن عن (Post, 1934)

1- رسم تخطيطي للنبات بشكل كامل يوضح الجذور والأوراق والأزهار

A- الشمراخ.   B- المبيض   C- القنابات

D- التبلات الخارجية   E- ظفر التبلة الخارجية   F- الأشعار

G- التبلات الداخلية   H- ظفر التبلة الداخلية   I- المئبر

J- القلم   K- تفرعات القلم   L- الميسم

M- الكم الزهري

2- القلم والميسم البتلي الشكل والسداة.

3- المبيض

4- مقطع عرضي في الثمرة.

5- البذور

6- بذور غير ناضجة

4-1 التصنيف النباتي:

السوسن من النباتات وحيدة الفلقة الريزومية التي تنتمي إلى العائلة السوسنية Iridaceae.

المملكة: Plantae

القسم: Magnoliophyta

الصف: Monocotyledon

الرتبة: Asparagales

العائلة: Iridaceae

الجنس: *Iris* (Mathew, 1989; Manning, 2004)

إن تصنيف الأنواع التابعة للجنس *Iris* فيها تداخلات واختلافات كبيرة ليس فقط في الصفات الشكلية والوراثية والكيميائية، وإنما أيضا في عدد الكروموزومات وشكلها وأطوالها بين الأنواع، ففي دراسة للكاريوتيب Karyotyping أجريت في الصين على عدة أنواع برية من السوسن لوحظ اختلاف كبير في عدد الكروموزومات وأطوالها بين الأنواع المدروسة حيث دلت الدراسة أن 2n=40 في نوع *I. germanica* وفي نوع *I. lacteal*، بينما 2n=36 في السوسن الياباني *I.japonica* ، وفي أنواع أخرى عدد الكروموزومات = 32 مثل *I.confusa* ويصل في بعض الأنواع الأخرى إلى 2n=26 كما في النوع *I. goniocarpa* (Yu *et al*., 2009). كما أن الأنواع الموجودة في جنوب سورية والقلمون تحتوي عدد من الكروزومات مختلف، حيث 2n=20، كما هو الحال في *Iris antilibanotica* و *I. Damascena* (Waters, 2011; Weymouth and Chaudary, 1975).

5-1 الجنس *Iris* في الفلورا السورية:

تمتلك سورية حسب أحدث الفلورات المتداولة (Mouterde, 1966, 80, 83) حوالي /٣٢٤٧/ نوعاً وعائياً تنتظم في أكثر من /١٣٠/ فصيلة وعائية وحوالي /٩١٠/ أجناس. وقد انعكس هذا الغنى بالأنواع على عدد الأنواع المحلية من جملتها عدداً من الأنواع البصلية والكورمية والريزومية التي تمتاز بجمال أزهارها، إضافةً إلى قيمتها الاقتصادية مثل بعض أنواع الزنبق *Lilium*، والتوليب *Tulipa*، والزعفران *Crocus*، والسوسن *Iris* وباعتبار أن هذه النباتات هي

عبارة عن أصول برية لنباتات مزروعة فإن الحفاظ عليها يعتبر ضرورة ملحة له مبرراته الاقتصادية والعلمية إضافةً إلى موجباته الوطنية والعالمية.

تمثل الفصيلة السوسنية في الفلورا السورية خمسة أجناس هي:

1- *Crocus* L. 2- *Gladiolus* L. 3- *Gynandiris* Parl. 4- *Romulea* Marttii. 5-*Iris* L

يمثل الجنس *Iris* في سورية الطبيعية 40 نوعًا (Post,1934) و30 نوعا منها ١٢ نوعاً مستوطنا (Mouterde,1966)، كما يمثل هذا الجنس في الفلورا السورية الجنيسات والأنواع التالية:

1- الجنيس Apogon: يضم عدة أنواع مثل *Iris pseudacorus* و *Iris careuleo-violecea*.

2- الجنيس pogoniris: يشمل عدة أنواع أيضا مثل *Iris mesopotamica*.

3- الجنيس Xiphion: تنتمي إليه أنواع عديدة مثل *Iris vartani*.

٤- الجنيس guno: كما يضم أنواع عديدة مثل *Iris postii* و *Iris musairiensis*.

5- الجنيس oncocyclus: إن معظم الأنواع السورية تنضوي تحت هذا الجنيس، غالبيتها من الأنواع المحلية، والعديد منها مهدد بخطر الاختفاء والزوال إذا لم توضع خطة لإنقاذ هذه الأنواع، خاصةً وإن هذه الأنواع ذات قيمة تزينيية وجمالية مميزة تأهلها احتلال مكانة مرموقة في عالم نباتات الزينة ومن هذه الأنواع نذكر: *Iris damascene* و *Iris calcarea* و *Iris antilibanotica* وأيضا

I.auranitica Dinsm: وهو نوع مستوطن في جبل العرب ينتشر في: تل كليب - الكفر - المياماس (Fred and Chittendeno, 1965) .

I.nigricans Dinsm: وهو نوع ينتشر في درعا وازرع (Post, 1934; Mouterde, 1983).

6-1 الزراعة والاكثار:

يتم إكثار نبات السوسن إما بذريا أو خضريا (الأبصال، الريزومات):

1-6-1 الإكثار البذري:

يعد إكثار السوسن بالبذور نادرا بسبب صعوبة إنباتها، إنتاج كميات قليلة من البذور في بعض الأنواع، القدرة على التلقيح الخلطي، طول فترة الحداثة، الوقت الطويل (٤–٥ سنوات) للحصول على كميات كافية تستخدم كمصادر نباتية (Boltenkov *et al*., 2007)، كما أن الإكثار البذري لا يحافظ على التماثل الوراثي للنباتات الناتجة عنه (Yabuya *et al*.,1991; Boltenkov *et al*., 2007)

1–٦–٢ الإكثار الخضري:

يتم إكثار السوسن إما بالأبصال أو بالريزومات:

الأبصال: تقلع أبصال السوسن من التربة في طور السكون بعد جفاف المجموع الخضري ثم تجفف وتنظف وتخزن في مكان ظليل جيد التهوية (البطل، 2003).

الريزومات: يمكن إكثار السوسن بواسطة تقسيم الريزومات إلى أجزاء لا يقل طول كل منها عن ٥–٧سم ويحوي كل منها على بعض الجذور والأوراق، أو يكتفى بأن تحتوي على برعمين على الأقل (الحكيم، ١٩٩٦)، ولكن نحصل على فرع واحد أو اثنان فقط من الريزوم الواحد في السنة الواحدة. بالإضافة إلى أن الإكثار بالريزومات بطيء جداً ولا يعطي قدرا كافياً من النباتات لتأمين متطلبات السوق (Hussey, 1975; Meyer *et al.,* 1975; Ichihashi and Kato, 1986; Yabuya *et al.,*1991; Jehan *et al*., 1994)

١–٧ الأهمية في تنسيق الحدائق:

للفصيلة السوسنية أهمية كبيرة في علوم البستنة كأزهار قطف وبشكل خاص أجناس السوسن والغلاديول والفريزيا (Goldblatt, 2002). تزرع نباتات السوسن داخل أحواض في الحدائق كما تزرع حول الأحواض وتستعمل في هذه الحالة كنباتات تحديد، وتزرع أيضاً في الحدائق الصخرية وفي الأصص التي تستعمل في مجال التنسيق الداخلي (البطل، ١٩٨٦). تفضل الأزهار الكبيرة والملتحية الطويلة في الحدائق، كما يعتبر استخدام بعض الأصناف القصيرة خيارا ممتازا في المناطق الشديدة الرياح التي تؤثر على الأصناف الطويلة. غالبا ما تظهر مجموعة

الأنواع الملتحية الطويلة العديد من السيقان الزهرية لإنشاء حدائق جميلة كما يمكن قطع بعض هذه السيقان لتوضع في المزهريات وتستخدم في مجال التنسيق الداخلي.

تتباين أنواع السوسن في قوة نموها وألوان أزهارها، وهذا ما يعطيها أهمية خاصة في تنسيق الحدائق عن الأنواع الأخرى التي تتميز بلون واحد فقط، ومن أنواع السوسن ما تجود زراعته حول حواف البرك ومجاري المياه مثل *I.Psuedoacorus* والذي تكون أزهاره صفراء في الربيع.

تعد بعض أنواع السوسن من النباتات الطبية والعطرية الهامة ومن الأنواع التي اشتهرت بهذه الناحية نذكر: *I. germanica, I. pseudacorus, I. florentina, I.tectorium* (Shu *et al.*, 2010) ولابد من الذكر بأنه يوجد بعض الأنواع التي تحتوي مواد سامة في جذورها الطازجة والرطبة ولذلك يحذر استخدامها طبيا كما هو الحال في النوع *Iris douglasiana* (Stevan and Anderson, 2003).

٢-أهمية البحث:

نظراً لما تتمتع به أنواع جنس السوسن *Iris spp* في سورية من خصوصيات جغرافية ومن مقومات جمالية واقتصادية، فضلاً عن أهميتها الخاصة في مجال الدراسات التطبيقية للتنوع الحيوي. من هنا جاء هدف البحث في إكثارها بالأنسجة عن طريق وضع تقنية مناسبة للإكثار وتحديد أهم المكونات الطبية فيها والمحافظة عليها كمصادر وراثية تخدم في مجال التحسين الوراثي، والتقنيات الحيوية والهندسية الوراثية لأغراض طبية وتزينيية وبيئية.

٣- مبررات البحث:

يضم هذا الجنس العديد من الأنواع المحلية والتي باتت نادرة أو مهددة بخطر الإختفاء والزوال، ولابد من الذكر بأنه من الصعب الفصل مابين النباتات النادرة والأخرى المهددة بالانقراض في الفلورا السورية نظراً لضعف الدراسات الميدانية الخاصة بالتنوع الحيوي من جهة، والتداخل مابين النباتات البرية النادرة مع الأنواع المتدهورة من جهة أخرى كالسوسن البري *I.Fumosa* الذي ينتشر بشكل قليل جدا في جبل الشيخ محسن وفي جبل سمعان وقد انقرض ولم يبق منه إلا عدة أفراد محدودة. كذلك السوسن الكلسي المسمى *I.calcarea* حيث أشار Mouterde في كتابه عن الفلورا السورية بأن هذا النوع بصدد الإنقراض إذ نادرا ما يصادف إلا في أماكن محدودة من جبل سمعان وعلى ضفاف نهر عفرين، يتصف هذا النوع بأزهاره الجميلة التي يعمل المزارعين على جمعها وبيعها (Mouterde, 1966). كما لوحظ بعض الأنواع الأخرى

التي أصبحت قليلة الانتشار مثل السوسن الأسود و الذهبي بفعل الجمع و التوسع بزراعـــة أشـــجار الفاكهة على حساب الغطاء النباتي البري.

٤-أهداف البحث:

١- تطبيق تقنية الإكثار الخضري الدقيق لإكثار السوسن الأسود والسوسن الذهبي.

٢- دراسة بعض العوامل المؤثرة في الإكثار الخضري الدقيق للسوســن مثــل طبيعــة العينــات المزروعة، التركيب المعدني والهرمونات النباتية.

٣- التحليل الكيميائي لزيت السوسن الأسود والسوسن الذهبي ومقارنتها مــع التحليــل الكيميــائي للسوسن الألماني ذي الفائدة الطبية.

الفصل الثاني

الدراسات المرجعية

LITERATURE REVIEW

2- الدراسات المرجعية:

2-1 مراحل الإكثار النسيجي:

تعد وسيلة الإكثار بالأنسجة النباتية من التقنيات الحيوية النباتية الهامة والتي لها مردود اقتصادي كبير، وتساهم بشكل كبير في تحسين الإنتاج الزراعي كما ونوعا. يسمح التكاثر الخضري الدقيق بإكثار وإنتاج أعداد كبيرة من النباتات الخالية من الأمراض (Ascough *et al*., 2008) والمشابهة للنبات الأم، كما تسمح بإكثار الأنواع والأصناف صعبة الإكثار بالطرائق التقليدية مثل شجرة النخيل وبعض أصول أشجار الفاكهة (المعري ,1995).

تلعب تقنيات زراعة الأنسجة النباتية دورا هاما في حفظ وإكثار الأصول الوراثية النباتية، حيث تعاني كثير من المصادر النباتية البرية في كثير من بلدان العالم من التدهور والضياع بسبب العوامل البيئية القاسية وبسبب التعديات عليها من قبل الإنسان من حيث الجمع الجائر والرعي والحرق وفلاحة المناطق الطبيعية لزراعات بديلة عن التنوع الحيوي الطبيعي، لذلك يمكن حفظ الأصول الوراثية البرية بوساطة زراعة الأنسجة وإكثارها للمحافظة عليها من التدهور والضياع وإعادة نشر زراعتها من جديد إضافة إلى الأغراض التجارية حيث تم إكثار حوالي ١٢ جنس و ٤٠ نوع تابع للفصيلة السوسنية بهدف تزييني (Ascough *et al*., 2009 a). إن هدف الإكثار الخضري الدقيق في بعض الأنواع المحلية للسوسن هو المحافظة عليها من التدهور والإندثار، وحفظ بعض الأنواع الهامة بواسطة زراعة الأنسجة كما في بعض الأنواع البرية المحلية في سورية وفي بعض الأنواع العالمية مثل النوع *I.pumila* (Radojevic *et al*., 1987)، والسوسن الأسود (Shibli and Ajlouni, 2000).

غير أن هناك بعض الصعوبات ما زالت تواجه زراعة الخلايا والأنسجة النباتية كتقنية حديثة مثل صعوبة تعقيم الأجزاء النباتية المستخدمة في الزراعة النسيجية وضعف الإكثار والتجذير لبعض الأنواع النباتية، كذلك ارتفاع تكاليف إنشاء مختبرات زراعة الأنسجة (Jones,1986). يعتبرالتلوث مشكلة حقيقية أثناء الإكثار الخضري الدقيق للنباتات أحادية الفلقة، خصوصا إذا تم استخدام الأجزاء تحت الأرضية مثل الكورمات، والأبصال، والريزومات والدرنات كمصدر للعزلات النباتية المستخدمة في طور الزراعة الأولية (Yildirim, 2007)، هذا بالإضافة إلى بعض الصعوبات الأخرى كصعوبة أقلمة بعض النباتات ونقلها إلى التربة أو المكان المستديم، واسمرار الجزء النباتي لبعض الأجزاء النباتية نتيجة لافراز بعض المواد الفينولية.

وبشكل عام تعتبر تقنية زراعة الأنسجة النباتية في النباتات أحادية الفلقة أكثر صعوبة مقارنة بالنباتات ثنائية الفلقة (Kamo *et al*., 1990; Wang and Nguyen,1990)، وعند دراسة القدرة على الإكثار ضمن بعض أحاديات الفلقة التزينية نجد أنها أقل في الفصيلة

السوسنية مقارنة مع الفصائل الأخرى مثل Amaryllidaceae و Araceae و Liliaceae (Hussey, 1975).

وفي السنوات الأخيرة أنجزت العديد من الدراسات لإكثار نبات السوسن مخبرياً وذلك باستخدام قمم الأفرع (Reuther,1977)، الريزومات (Kromer,1985)، الأزهار الفتية (Meyer *et al*., 1975) الأجنة (Stoltz,1977)، الأفرع (Radojevic *et al*., 1987) وحراشف الأبصال (Van der Lind and Hol,1988)، ولكن جميع هذه الدراسات أوضحت أن استجابة السوسن لزراعة الأنسجة صعبة و ضعيفة ما عدا دراسة واحدة فقط وهي (Reuther, 1977). ومن أكثر العزلات المستخدمة للزراعة الأولية في العائلة السوسنية الكورمات والأزهار (Ziv and Lilien-Kipnis, 2000).

تم إكثار العديد من أنواع السوسن بواسطة تقنية زراعة الأنسجة النباتية مثل السوسن الهولندي (Fujin *et al*.,1971; Hussey, 1976)، النوع *Iris ensata* (Yabuya *et al*., 1991)، الأنواع *I.pseudacorus*، *I.setosa*، *I.versicolor* (Laublin *et al*., 1991)، النوع *I.pallida* (Gozu *et al*.,1993)، النوع *I.pumila* L. (Radojevic *et al*,1987) وأنواع السوسن الملتحية *I.germanica* L. (Meyer *et al*.,1975)، وبعض الأنواع المستخدمة في الحدائق (Mielk and Anderson,1989).

تتأثر تقنيات الإكثار بالنسج بجملة عوامل، منها ما هو متعلق بالنبات الأم مثل (عمر النبات الأم شروط زراعة النبات الأم، موعد أخذ العينات النباتية، طبيعة العينات النباتية المزروعة.....)، ومنها ما هو متعلق بتركيب الأوساط المغذية مثل (التركيب المعدني، نسبة السكروز، نوع وتركيز الهرمونات النباتية، طبيعة الأوساط المغذية سائلة أو صلبة ....)، ومنها ما هو متعلق بشروط غرف النمو (درجة الحرارة، الإضاءة، فترة وشدة الإضاءة، ونسبة الرطوبة) (المعري، ١٩٩٥).

تشمل عملية التكاثر الخضري الدقيق المراحل التالية:

1-1-2 مرحلة الزراعة الأولية Initial Culture:

تعد مرحلة الزراعة الأولية أو ما يسمى الزراعة التأسيسية أولى مراحل الزراعة النسيجية، حيث تهدف إلى الحصول على عينات خالية من التلوث وقادرة على النمو. تعد عملية التعقيم السطحي (Surface Desinfection) للأجزاء النباتية المستخدمة في الزراعة (Explant) أول وأهم الخطوات التي يعتمد عليها نجاح زراعة الأنسجة، ويقصد بها تعقيم العينات النباتية بهدف قتل الكائنات الدقيقة التي تنمو على السطح الخارجي للجزء النباتي المستخدم في عملية الزراعة.

تم تعقيم ريزومات نبات السوسن الألماني بتركيز ٢٥٠ مغ/ل هيبوكلوريت الصوديوم لمدة ٦٠ دقيقة ثم تم تقطيع الريزومات إلى قطع أصغر وعقمت مرة ثانية بنفس التركيز السابق من

هيبوكلوريت الصوديوم ولكن لمدة ٢-٣ ثانية (Shimizu *et al*.,1997). تم تعقيم كورمات نبات *Gladiolus anatolicus* التابع للفصيلة السوسنية باستخدام 70 % ايتانول لمدة ١٧ دقيقة و٤.٥ % هيبوكلوريت الصوديوم لمدة ٢٠ دقيقة ثم (Ziv,1989; Emek and Erdag,2007) غسلت العينات بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لازالة آثار التعقيم السابقة، بينما استخدم Yildirim عام ٢٠٠٧ الكحول بتركيز ٧٠% لمدة ٣٠ ثانية لتعقيم البراعم القمية والجانبية المأخوذة من كورمات نبات الزعفران، ثم ٠.١٥ % من كلور الزئبق لمدة ٢٠ دقيقة.

تعد الأبحاث المتعلقة بزراعة الأنسجة قليلة نسبياً في السوسن بالمقارنة مع النباتات الأخرى. يتم إكثار السوسن بالنسج بعدة طرق إما عن طريق تكوين مباشر للأعضاء النباتية (Direct Organogenesis) أو عن طريق تكوين مباشر للأجنة الخضرية (Direct embryogenesis). ويوجد دراسات متعددة ضمن هذا السياق، حيث تم الحصول على التشكل المباشر للنموات دون المرور بمرحلة الكالس من السيقان الزهرية المأخوذة من السوسن الياباني (*Iris ensata*) عند زراعتها في وسط 1/2MS مع إضافة 1 مغ/ل BA + 1مغ/ل NAA + 30 غ سكروز + 10 غ/ل آغار (Yabuya *et al*, 1991)، كما تم استخدام الأجزاء الزهرية في إكثار نبات السوسن بطرق مباشرة بالنسبة للنوع *I.ensata* (Ichihashi and Kato,1986; Kawase *et al*., 1995). تعتمد طرق تخلق الأعضاء على الأنواع النباتية وعلى نوع الهرمونات المضافة إلى الوسط الغذائي كما يتطلب تخلق الأعضاء تحقيق التوازن بين هذه الهرمونات، وعلى سبيل المثال نذكر أنه تم التخلق بشكل مباشر من الأعضاء الزهرية للنوع *I.ensata* باضافة الهرمونات التالية NAA وBAP، أما بالنسبة للأنواع *I.setosa* و *I.sanguineal* كان بإضافة 2,4-D وBAP، بينما تم الحصول على التخلق بشكل غير مباشر بإضافة 2,4-D (Boltenkov and Zarembo, 2005)، كما أن تراكيز الهرمونات المستخدمة تلعب دورا كبيرا في تخلق الأعضاء فقد أدى استخدام المزيج المؤلف من ١ مغ/ل 2,4-D + ١ مغ/ل BAP إلى تخلق الأعضاء بشكل مباشر في نبات الزعفران في حين أن استخدام النسبة ٠.٢٥ : ١ (لكلا الهرمونين السابقين على التوالي) أدى إلى تخلق الأعضاء بشكل غير مباشر في نفس النبات (Yildirim, 2007). إن الجزء النباتي المستخدم في زراعة الأنسجة النباتية (Explants) هو نسيج أوجزء من عضو نباتي يتم استئصاله من العينات النباتية وزراعته في وسط غذائي، كما أن نجاح زراعة الأجزاء النباتية يعتمد على عدة عوامل، منها ما يتعلق بالجزء النباتي نفسه (مصدره - عمره الفيزيولوجي- موعد أخذه)، حالة الفتوة والحالة الصحية للنبات الأم، وتداخل المحتوى الهرموني مع الوسط الغذائي (الأطرقجي، 1996)، لذلك فان اختيار الجزء النباتي يجب أن يتم بكل دقة وإتقان، وخاصة أن الأنسجة النباتية المختلفة لا تعد ذات قابلية واحدة للنمو والتفرع (سيد محمد وعمر، 1990).

يتم الإكثار الدقيق للسوسن باستخـدام أجـزاء نباتية مختلفة مثل البراعــم الريزوميــة، قواعد الأوراق، القمم النامية، والأجـزاء الزهريــة.

لوحـظ زيادة القـدرة على تشكيل النموات عنـد زراعة عينات زهريــة مكونة مــن نقطــة اتصال المبيض بالغــلاف الزهــري فــي السوسن السيبيري (Asao *et al*., 1993).

تــم إكثار العديد مــن أنواع السوسن مخبريا عن طريــق تخلق الأعضاء أو تخلــق الأجنــة الجسميــة باستخـــدام عــزلات مــن قواعــد الأوراق (Gozu *et al*.,1993; Shibli and Ajlouni, 2000; Jevremovic and Radojevic, 2006)، أجنــة البويضــة (Radojevic and subotic, 1992; Boltenkov *et al*., 2007)، المبــــيض (Laublin and Cappadocia, 1992)، والجذور (Laublin *et al*., 1991).

تعد قواعد الأوراق الفتية مناسبة لإحداث التعضي المباشر مخبرياً في العديـد مــن أنــواع السوسن (Wang *et al*., 1999 a)، كما اختبر Kawase وآخرون في عام 1995 قــدرة أجــزاء زهرية مختلفة (المدقات – غلاف الزهرة – الأسدية– المآبر– المبيض– الساق الزهرية – الخــيط – نقطة اتصال المبيض بغلاف الزهرة) في استجابتها للنمو. وبينت النتائج أن نقطة اتصال المبيض بغلاف الزهرة والجزء العلوي من المبيض في صنف Fujibakama والمزروعة في وسط يحــوي BA، NAA تنتج أفرع عرضية عن طريق التعضي المباشر دون المرور بمرحلة الكــالس بينمــا لوحظ تشكل الأعضاء من الأجــزاء السفلى للمبيض فقــط عنــد الزراعة على وسط يحوي علــى 5 مغ/ل من BA + 5 مغ/ل منNAA .

يعد الوسط الغذائي من أهم العوامل التي تؤثر في طبيعة نمو الجــزء النبــاتي وانقســامه وتمايزه، وذلك لإحتوائه على الاحتياجات الغذائية اللازمة لنموه، حيث تكــون الخلايــا والأنســجة والأعضاء المزروعة داخل الأنابيب غير قادرة على القيام بعملية التمثيل الضوئي وتصنيع غــذائها بصورة ذاتية. يتكون الوسط المغذي عادة من: أملاح معدنية، مصدر كربوني، فيتامينات، منظمــات نمو، ومركبات عضوية معقدة التركيب أحياناً. تختلف الاحتياجات الغذائية باختلاف نــوع النبــات، الجزء المزروع، حالته التطورية، ومرحلة النمو (الكناني،١٩٨٧؛ المعري، ١٩٩٥)، لذلك لا يمكن التوصية بوسط غذائي واحد لجميع الأنواع النباتية، حيث أن بعض الأنواع حساسة للتراكيز العاليــة من الأملاح ولها متطلبات مختلفة من العناصر المغذية (George *et al*.,2008). يعــد المحلــول المعدني لــ MS (Murashige and Skoog, 1962) من أكثر الأوساط اســتخداماً فــي إكثــار النباتات المختلفة بزراعة النسج.

تلعب الهرمونات النباتية دورا هاما في مدى استجابة العينات النباتية للنمو داخل الأنابيــب. يختلف النوع والتركيز والتوازن الهرموني المطلوب بحسب طريقة الإكثار المتبعة وحسب مرحلــة

الإكثار وحسب النوع النباتي المستخدم. وجد Jehan وآخرون عام 1994 أن اضـــافة L-proline وCasein hydrolysate كان مهما كمواد مشجعة في مرحلة استحداث تخلق الأجنة الجسمية. تــم دراسة تأثير السيتوكينينات والأوكسينات في زراعة السوســن مخبريــاً، حيــث بينــت النتــائج أن إضافة NAA والكينيتين أو BA كان مهماً لتشكيل النموات من قواعد الغلاف الزهــري، أونقطــة اتصال المبيض بالغلاف الزهري في السوسن الســيبيري *Siberian Iris* (Asao *et al*.,1993)، من حامل الزهرة في السوسن الملتحي الطويل (Meyer *et al*.,1975)، ومن المبايض والســيقان الزهرية في السوسن الياباني (Ichihashi and Kato, 1986; Yabuya *et al*., 1991).

يعد الضوء من العوامل المؤثرة جدا في نجاح زراعة الأنسجة، وله دوراً رئيسياً في عملية التمايز، بحيث توضع الزراعات النسيجية في الضوء لاستحداث التمايز فيها (سيقان واوراق)، بينما للحصول على الكالس توضع في الظلام. أما بالنسبة لشــدة الإضــاءة (Light Intensity) تمتلــك النباتات ردود أفعال مختلفة تعود إلى عدة عوامل منها البنية التشريحية، والعوامل الفيزيولوجيــة و المورفولوجية (Koetle, 2009)، وعلى سبيل المثال نجد أن نمو الأفرع كان أعظميــا فــي شــدة إضاءة منخفضة ٣٠ ميكرومول/م^{٢} ثا (Jo *et al*., 2008) وغالباً ما تزداد بتقدم مراحل الزراعــة، حيث يحتاج الجزء المزروع إلى ضوء قليل الشدة في المرحلة الأولى من الزراعة النسيجية، بينمــا تصل خلال مرحلة الإكثار والتجذير إلى 3000 لوكس.

تم وضع العزلات المأخوذة من نبات الغلاديول في غرفة النمو المزودة بإضاءة ١٦ ســاعة إضاءة وشدة ضوئية بمقدار ٢٠٠٠-٣٠٠٠ لوكس (Aftab *et al*., 2008)، و على الرغم مــن أن معظم الباحثين لاحظوا أن تكوين الأجنة الجسمية من الممكن أن يحدث- فقط تحت ظروف الإضاءة الضعيفة (Laublin *et al*.,1991) وجد Jevremovic وRadojevic عام 2006 حدوث التخلــق الشكلي تحت شروط الإضاءة الكاملة حيث قام باستحداث الأجنة الجسمية من قواعــد أوراق النــوع *I.pumila* في الشــروط التاليــة: ١٦ ســاعة إضــاءة / ٨ ظــلام وشــدة ضــوئية بمقــدار ٥٠ ميكرومول/م^{٢}ثا.

من الضروري الاهتمام بالرطوبة النسبية في غرفة نمو النباتات، لأن انخفــاض الرطوبــة النسبية في غرفة النمو يؤدي إلى سرعة جفاف الوسط وتشققه، مما يتطلب إعــادة الزراعــة فــي أوساط جديدة، وهي عملية مكلفة ماديا وتؤدي لزيادة احتمال التلوث حيث أن عدم السيطرة على جو غرفة التحضين يؤدي إلى تراكم الغازات والمسببات المرضية التي تؤدي لتلف المزروعات (ســيد محمد وعمر، 1990) لذلك يفضل تركيب أجهزة رطوبة توفر نسبة محددة من الرطوبة النسبية فــي جو غرفة التحضين.

2-1-2 مرحلة الإكثار والاستطالة Multiplication and Elongation Stage:

يهدف هذا الطور إلى الحصول على أفضل معدل من النموات الخضرية ذات الاستطالة الجيدة والخالية من الشفافية (Almaarri *et al.*, 1986). أكد Thrope عام ١٩٨١ ضرورة معرفة الوسط الغذائي المناسب، ومصدر الجزء النباتي المستعمل لضمان نجاح زراعة الأنسجة النباتية مخبريا. تم الحصول على أعلى معدل لإكثار الأفرع من حراشف أبصال *Iris hollandica* في وسط يحوي نصف تركيز أملاح موراشينج وسكوج 1/2MS، كما أن تشكل الأبصال حدث بشكل كبير باستخدام الوسط المغذي (1/2MS) وتراوح عدد الأبصال المتكونة من العزلة الواحدة ٢-٦ أبصال (Van der Lind *et al*., 1988). كما لوحظ أن تشكل البراعم من الأجزاء العليا المأخوذة من المبيض أكبر من الأجزاء السفلى بالنسبة لنبات السوسن (Kawase *et al*., 1995).

بينت النتائج أن تشكل الأفرع مخبريا في النوع *Zingiber spectable* تم عندما نقلت البراعم الريزومية إلى وسط 1/2 MS يحوي 10µM BA (Faria and Illag,1995). بينت العديد من الدراسات أن الهرمونات المضافة إلى الوسط الغذائي كانت من أكثر العوامل تأثيرا في الإكثار الخضري الدقيق لنبات السوسن (Radojevic *et al*.,1987; Laublin *et al*.,1991; Radojevic and Subotic,1992; Gozu *et al*., 1993; Jehan *et al*.,1994; Shimizu *et al*., 1996; Wang *et al*.,1999b).

تحرض السيتوكينينات انقسام الخلايا حيث تقلل من السيادة القمية و تشجع نمو البراعم الجانبية (Ranjan *et al*., 2003)، كما أن إضافة تراكيز منخفضة من الأوكسين مع السيتوكينين يزيد من إعادة قدرة الأفرع على التكاثر بالمقارنة مع استخدام BAP لوحده (George,1993)، كما تبينت مقدرة BAP في تشكل الأفرع الجانبية (Khaleghi *et al*., 2008) وبشكل عام تبدي النباتات العشبية استجابة جيدة لهذا الهرمون (Debergh and Zimmerman,1991). بينت الدراسات التي قام بها Balchandran وزملاؤه في عام ١٩٩٠ أن أعلى معدل إكثار للنوع *Curcuma longa* تم في وسط MS مضاف له 3 مغ/ل BA، في حين وجد Malmug وآخرون عام ١٩٩١ أن المعدل الأعلى للإكثار بالنسبة للنوع ذاته تم بإضافة 1مغ/ل NAA + 5 مغ/ل BA إلى نفس الوسط. كما قام Emek وErdag عام ٢٠٠٧ بدراسة تأثير منظمات النمو النباتية في تشكل الأفرع مخبريا وذلك من الكالس المستحصل عليه من كورمات نبات الغلاديول التابع للفصيلة السوسنية، ووجد أن أفضل معدل إكثار كان باضافة ٠.٢مغ/ل BAP + ٢ مغ/ل NAA. تعد طريقة الإكثار بالأجنة الخضرية إحدى وسائل إكثار أنواع السوسن بالنسج وذلك إما عن طريق تكوين الكالوس الجنيني أو عن طريق التكوين المباشر للأجنة الجسمية. فقد تم الحصول على الكالس من العزلات المأخوذة من قواعد أوراق النوع *Iris adriatica* في الظلام، وفي درجة حرارة ٢٤ م في ثلاثة أوساط جميعها تحوي المحلول

المعدني الكامل (MS) والمضاف له 4.52 µM من 2,4-D + 4.83 µM مـــن NAA + 0.46 µM كينيتين +5% سكروز+ 200 مغ/ل من hydrolysate casein، واختلفت هذه الأوساط فـــي محتواها من الفيتامين أو البرولين، كما تم الحصول على كالس من زراعة مبـــايض الأزهـــار فـــي وسط MS يحوي 45.25 µM من 2,4-D (Keresa *et al*., 2009).

يجب توفير درجة الحرارة المناسبة للحصول على أفضل نمو للجـــزء النبـــاتي، ودراســـة إحتياجات الجزء المزروع من الحرارة اليومية لليل والنهار، حيث تختلف الإحتياجات من الحرارة اليومية من نبات إلى آخر ومن مكان الى آخر، فقد تم الحصول على أعلى معدل لإنتاج الأفرع من حراشف أبصال *Iris hollandica* في درجة حرارة 20 م وفي الظلام. بينما تم وضع العـــزلات المأخوذة من نبات الغلاديول في غرفة النمو عند درجة حرارة ٢٥±٢ م (Aftab *et al*., 2008).

من الضروري جداً للحصول على أفضل نمو تحديـــد الفتـــرة الضـــوئية (Photoperiod) الملائمة لنمو الجزء المزروع. بصورة عامة يعتبر تعريض العينات النباتية المزروعة لفترة ضوئية مقدارها 16 ساعة إضاءة يومياً و8 ساعات ظلام أفضل برنامج ضـــوئي فـــي زراعـــة الأنســـجة (Morini *et al*.,1991). حيث تؤثر الفترة الضوئيـــة في مختلف العمليات الحيوية مثل التجـــذير، استطالة الأفرع (Ramanayake *et al*., 2006)، تشكل أعضاء التخزين مخبريا (Ascough *et al*.,2008).

تم دراسة تأثير فتـــرة وشـــدة الإضاءة فـــي معـــدل إكثـــار أفـــرع *Dierama erectum* التابـــع للفصيلة السوسنية، وتبين أن تعريض النباتات للإضاءة لمـــدة ١٦ ساعة وشـــــدة بمقـــدار ١٠٠ ميكرومول/م^٢^ ثا أعطت المعدل الأعلى للإكثار، في حين أن المدة الأقل من ٢٤ ساعة والشدة الأقل من ١٠٠ ميكرومول/م^٢^ ثا أثرت سلبيا في النمو والإكثار (Koettle, 2009). وفيمـــا يتعلـــق بنوعية الضوء (Light Quality) فتحدد حسب الحاجة. يلعب الضـــوء الأزرق دوراً أساســـياً فـــي نشوء الأوراق والسوق في العديد من النباتات، في حين يعد الضوء الأحمر ضرورياً للدفع الجذري ونمو الأوراق (George, 1993).

عند دراسة تأثير تركيز السكروز في معدل الإكثار، تبين بأن زيادتـــه أدت إلـــى انخفـــاض بسيط في معدل إكثار الألستروميريا (Kristiansen *et al*., ١٩٩٩)، في حين أن وجوده بتركيـــز 20 غ/ل في وسط الشاهد أعطى أفرعـــاً أكثـــر قوة فـــي الزراعات الثانويـــــة لنبـــات الليليـــوم (Nhut *et al*., 2001). تم دراسة تأثير تركيز الوسط والنتروجين في تشكل الأفـــرع فـــي نبـــات الزنجبيل، وبينت النتائج أن النتروجين المستخدم بشكل KNO_3 أدى إلى زيادة في معـــدل الإكثـــار بشكل معنوي سواء تم استخدامه كاملا أو بنصف التركيز، كما أن نمو الأوراق كـــان أفضـــل فـــي وسط لا يحوي NH_4NO_3 (Villamor, 2010).

3-1-2 مرحلة التجذير Rooting Stage:

تهدف هذه المرحلة إلى الحصول على أعلى نسبة تجذير بحيث تكــون الجــذور المتكونــة رفيعة، وعددها جيد وخالية من الكالوس في قواعد العينات النباتية (ALMaarri *et al*.,1994).

بشكل عام، إن وجود أي نوع من السيتوكينين في مرحلة التجذير يعمل على تثبيط تكــوين الجذور لذا يتوجب أن يكون وسط التجذير خالٍ من السيتوكينين، أو يحوي على تركيز خفيف منــه بحيث تكون نسبة الأوكسين/ السيتوكينين أكبر من الواحد (Pelkonen, 2005).

يؤثر تركيز الوسط المغذي في نسبة تجذير العينات الناتجة عن عملية الإكثار بالنسج، فقــد بينت النتائج أن استخدام وسط MS الممدد إلى النصف أو الثلث يزيد من نســبة تجــذير العينــات النباتية المزروعة بالنسج (Meenakshi *et al.,* 2001; Dipti *et al*., 2005)، كما وجد أن وسط MS كامل بــ ½ NO_3 أعطى أعلى نسبة تجذير، وأعلى متوسط لعدد الجذور في نبات الكســتناء (Vieitez and Vieitez,1983).

يلعب الأوكسين الدور الأساسي في التحكم الهرمــوني للإكثــار ذو العلاقــة الكبيــرة مــع الهرمونات داخلية المنشأ ومنظمات النمــو الأخــرى ويكمــن تأثيــره فــي التمــايز الخلــوي (Boltenkov and Zarembo, 2005). يلعب دورا هاما في تجذير العينات النباتية الناتجــة عــن الإكثار بالنسج، كما يؤثر نوع الأوكسين على نوعية واستطالة الجذور المتشــكلة، حيــث تبــين أن استخدام NAA أعطى جذور قصيرة وثخينة في نبات *Sisyrinchium laxum* التــابع للفصــيلة السوسنية، كما أعاق التجذير في نبات *Dierama erectum* ، بينما أعطى الهرمون IBA أفضــل نوعية للجذور فكانت ليفية رفيعة وطويلة، وكذلك كانت الأطول والأكبر عــددا (Koetle, 2009; Ascough *et al*., 2011). وجد Yabuya وآخرون عام 1991 أن إضافة 1 % من الفحم النشط إلى الوسط المغذي كان له تأثيرا ملحوظاً في استحداث الجذور، وهذا التأثير كــان مســتقلاً عــن تركيب الوسط والأنواع النباتية التي تم اختبارها، كما وجد Poonsapaya وآخرون عام 1993 أن اضافة ١٠% من الفحم النشط مــع ٠.٥ مغ/ل NAA حقق أفضل نسبة تجذير في نبات الزنجبيــل *Zingiber cassumunar*، كما حقق استخدام المحلول المعدني MS بنصف تركيزه مــع ٥٠ غ/ل من السكروز أفضل نسبة تجذير في نبات sugarcane (Ramanand *et al*., 2007).

وجد Pierik وآخرون عام ١٩٩٧ بأن الحرارة المثالية في غرفة النمــو خــلال مراحــل الزراعة النسيجية لقمم الريزومات هي ٢١ ْم لأنها حققت أعلى نسبة تجذير وأكبــر عــدد للجــذور مقارنةً مع درجات الحرارة25 و27 ْم.

4-1-2 مرحلة التقسية Acclimatization Stage:

وهي عملية نقل العينات النباتية من الأنابيب إلى الظروف الطبيعية وهي مرحلة حساسة وتحتاج إلى ظروف مثالية داخل بيوت محمية حتى يتم الحصول على معدل تقسية عالي، إذ تكون هذه المرحلة الأكثر حرجاً ودقة و تعد من أهم الخطوات في برنامج الإكثار الخضري الدقيق عن طريق زراعة الأنسجة (المعري، ١٩٩٥).

تختلف الفترة اللازمة للإنتقال من المرحلة غير ذاتية التغذية إلى المرحلة ذاتية التغذية باختلاف النباتات. يجب أن تتم العملية بعناية فائقة، كما يجب تأمين مستلزمات نجاحها كافةً من حيث توفير النباتات جيدة النمو الصالحة لعملية النقل والتي تمتاز بمجموع خضري وجذري جيدين، بالإضافة إلى توفير الشروط الجوية المناسبة من حرارة وإضاءة ورطوبة مع بيئات مناسبة لإستمرار نمو النبات وتطوره. لذلك لابد من القيام بعملية التقسية في ظروف البيوت المحمية والتي يتم فيها التحكم بكافة الشروط الجوية المطلوبة (Kyte and Kleyn, 1996). تتأثر نسبة نجاح عملية الأقلمة بتغير نوع وتركيز الأوكسين كما في نبات *Watsonia* التابع للفصيلة السوسنية (Ascough *et al*., 2007).

تبين أن التبريد القاعدي السفلي يعمل على تقليل الرطوبة النسبية في الفراغ العلوي للأوعية وهذا الإجراء كان فعالاً أثناء تقسية كل من *Maranta, Rosa, Iris* (Maene and Debergh, 1983).

يجب أن توضع أغطية الأوعية بشكل غير محكم بحيث تسمح لبخار الماء بالتسرب نحو الخارج ومن الطرق الفعالة للتقسية هو استخدام أغطية مع فلتر والذي يسمح لبعض الهواء بالتبادل بشكل تدريجي عوضا عن إزالة الغطاء (Kyte and Kleyn, 1996).

بينت النتائج أن معدل البقاء للقرنفل تقارب من 90 % عندما تم نزع الغطاء بعد تسعة أيام مع رطوبة نسبية 50-70 % وذلك قبل نقلها إلى التربة (Ziv,1986). كما بلغت نسبة نجاح عملية الأقلمة للنوع *Iris pumila* 64 % وذلك بعد سنة من إجراء هذه العملية (Jevremovic and Radojevic, 2006). تم تقسية النباتات التابعة للفصيلة السوسنية في أصص تحوي ١:١ من كل من التربة والفيرميكيوليت في بيت ضبابي لمدة أسبوعين، ثم نقلت إلى البيت البلاستيكي فشكلت كورمات بعد شهرين، وكانت نسبة نجاح التقسية ٧٣% (Koetle, 2009). يتم تعريض النباتات النامية في مرحلة التقسية إلى شدة إضاءة عالية تصل إلى 10000 لوكس وذلك لتحفيز النباتات على البدء بعملية التمثيل الضوئي، وعلى الرغم من أن الضوء يعتبر مصدر للطاقة، إلا أن الضوء الزائد يؤدي إلى إنخفاض في كفاءة التمثيل الضوئي أو إعاقته (Jo *et al*., 2008).

2-2 الإسمرار Browning :

تعمل الأجزاء النباتية المزروعة على أوساط مغذية على إفراز بعض المركبات السامة داخل الوسط مثل المركبات الفينولية التي تؤدي إلى إسمرار المحلول والجزء النباتي المزروع وموته، أما الأنزيمات المسؤولة عن ظاهرة الإسمرار فهي البولي فينول أوكسيداز وأنزيم البيروكسيداز (Pan and Van Staden,1998 ; المعري ،١٩٩٥).

يحفز أنزيم بولي فينول أوكسيداز على أكسدة المركبات الفينولية والذي ينتج عنه كوينونات تؤدي (Onay and Jeffree, 2000 ; Leng *et al.,* 2009) إلى تبلمر البروتينات الذي ينتج عنه صبغات الميلانين.

كما أن اسمرار العينات لا يتعلق فقط بالعزلات المستخدمة في الزراعة التأسيسية وإنما بالطور الفيزيولوجي للنبات الأم أو بالفصل الذي تم جمع العزلات النباتية فيه Werner and Boe,1980; Yepes and Aldwinckle, 1994; Dobranszki *et al.*,) .(2000a

ترتبط فاعلية أنزيمات الأكسدة بالعوامل البيئية حيث أن الضوء يزيد من نشاط هذه الأنزيمات (linington,1991; Wang *et al.*,1994; Pan and Van Staden,1998)، بينما تقلل إنخفاض درجة الحرارة من تأكسد الفينولات عن طريق تقليل نشاط الأنزيمات (Hildebrandt and Harney, 1988; Wang *et al.*,1994). تتأثر نسبة الإسمرار بتركيز الهرمونات المضافة، فقد لوحظ غياب الإسمرار في النموات الناتجة عن نقطة اتصال المبيض بالغلاف الزهري عند إضافة BA وNAA بتركيز 1مغ/ل، بينما كانت نسبة الإسمرار 22% عند إضافة BA وNAA بتركيز 5 مغ/ل (Kawase *et al.*,1995).

ومن جهة أخرى يمكن إضافة عدة مواد إلى الوسط المغذي مثل حمض الأسكوربيك مع حمض السيتريك، PVP والفحم النشط تمنع إنتاج الفينولات أو تمتص المواد الفينولية من الوسط الغذائي مثل مضادات الأكسدة أو المواد المدمصة.

(Jones,1985; Wang *et al.*, 1994; Yepes and Aldwinckle, 1994; Block and Lankes, 1996; Pan and Van Staden, 1998; Dobránszki *et al.*,2000a; Thomas, 2008).

٢-3 التحليل الكيميائي والتأثيرات البيولوجية:

تعد الريزومات مع الجذور الجزء الطبي في معظم أنواع السوسن، حيث يحتوي على الزيت الطيار (α, β, Iron) التي تعطي رائحة البنفسج، والتربينات والفلافونيدات، كما يستخدم الزيت الطيار المستخرج من الريزومات في صناعة العطور (Guvenc *et al*., 2005).

وجد أن للايزوفلافونات التالية (irilone ،irisolidone) التي تم عزلها من ريزومات السوسن الألماني نشاط مناعي وتؤثر على إنتاج الخلايا اللمفية والسايتوكينات المناعية (Nazir *et al*., 2009). يقلل المستخلص المائي للسوسن الألماني من نشاط العضلات الملساء (Miyake *et al*.,1997) كما قام Rahmann وآخرون في عام 2003 بعزل irigenin، Nigricin من ريزومات السوسن الألماني كما تم أيضا عزل Irigenin من أنواع السوسن المختلفة وأظهرت خواص مضادة للبكتيريا وللفطريات (Su *et al*., 2000).

قام Deng وآخرون في عام 2009 تحليل إحدى وثلاثين مادة كيميائية من الزيت باستخدام الكروماتوغرافيا الغازية (GC-MS) وتم تحديد 99.99% من مكونات الزيت وكان من أهم هذه المركبات aristolone (40.26%) وcuparene (10.88%)، ويمكن أن يستخدم الزيت المستخلص من الريزومات في علوم الصيدلة وصناعة مستحضرات التجميل. وجد أن لزيت النوع (*Iris bulleyana*) نشاط مضاد للبكتيريا والفطريات ونشاط مضاد للأكسدة وربما يعود هذا النشاط إلى احتوائه على المواد التالية α-cadinol, camphor , cuparene, α and β-pinene, limonene (Deng *et al*., 2009).

إن لأنواع السوسن أهمية طبية كبيرة وتستعمل في علاج الزكام، الإنفلونزا، الملاريا، الرضوض والكدمات (Lin *et al*., 2002)، معالجة الحمى وأمراض الكبد الصفراوية (Evans, 2002) السرطان، الإلتهابات، بالإضافة إلى الأمراض الفيروسية والبكتيرية وكمضاد تشنج (Rahmann *et al*., 2003)، مقيئ وملين (Seki *et al*., 1994) والمركبات المعزولة من هذه الانواع كانت تستخدم كمواد مضادة للأورام (Rahmann *et al*., 2003; Farag *et al*., 2009)، مواد مضادة للأكسدة والالتهابات (Rahmann *et al*., 2003)، وأيضا استخدمت كمواد مضادة للفطور والملاريا (Benoit-Vical *et al*., 2003)، كما يستخدم عصير ريزوم السوسن الألماني *Iris germanica* في علاج التقرحات الجلدية وإزالة النمش ولتنقية الدم وللأمراض التناسلية (Ali and Mathew, 1993). كما يستخدم مغلي الجذور لعلاج مرض الاستسقاء والمرارة، مضاد تشنج، مدر، وملين (Hanawa *et al*.,1991).

وقد وجد العلماء تأثيراً واضحاً لمستخلصات بعض أنواع السوسن (*I. versicolor*, *I. germanica*, *I.tectorum*, and *I. bullyana*) في تثبيط نمو بعض أنواع

البكتريا الممرضة للإنسان مثـــل *Echerchia coli, Salmonella Typhui, Staphylococus aureus, and Clostridium* . وقـــد لوحـــظ وجـــود بعـــض المـــواد الفعالـــة التـــي لهـــا علاقـــــة مباشـــرة بالتـــأثير علـــى البكتريـــا مثـــل مركبـــات Iridals و Iridin (Bartram,1995; Hoffmann,1996; Deng *et al*., 2009).

يعود النشاط العالي المضاد للفطريات لوجود مركب limonene ذو التـــأثير القـــوي علـــى الفطور (Filipowicz *et al*., 2003).

الفصل الثالث: مواد البحث وطرائقه

MATERIALS AND METHODS

٣- مواد و طرائق البحث:

1-3 مكان تنفيذ البحث Site of Research:

تم تنفيذ هذا البحث في مخبر التقانات النباتية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وفـــي كليـــة الزراعة بجامعة دمشق خلال العامين 2010-2011.

2-3 المادة النباتية المستخدمة Plant material:

جمعت ريزومات نباتات السوسن الأسود والذهبي من خلال القيام بمجموعة من الجـــولات الحقلية في محافظتي درعا والسويداء (المياماس) إذ تنمو فيهما بشكل بري (الشكل، ٥)، تم استخدام عدة مصادر للعينات النباتية (من الريزومات، من قواعد الأوراق) للإكثار الخضري الدقيق، بينما تم استخدام الريزومات فقط للتحاليل الكيميائية.

١-السوسن الأسود *Iris nigricans* : نبات عشبي معمر بواسطة الريزومات، الأوراق منجليـــة، الساق بارتفاع ١٥-٣٠ سم كما هو موضح في الشكل (٢).

٢-السوسن الذهبي *Iris aurantica*: نبات عشبي معمر بواسطة جذاميره، الساق متفرعة ترتفـــع حتى ٥٠ سم، الأوراق منتصبة تقريبا، البتلات الخارجية والداخلية بلون أصفر برونزي، البتلات الداخلية ذات عروق ونقط بنية محمرة (الشكل، ٣) .

كما تم جمع ريزومات نبات السوسن الألماني *Iris germanica* (الشكل، ٤) النامية داخـــل مشتل وزرعت في بيت بلاستيكي في كلية الزراعة بجامعة دمشق لتكون مصدراً دائماً للعينات. وتم استخدام الريزومات فقط كشاهد للتحاليل الكيميائية.



الشكل (٢): زهرة نبات السوسن الأسود



الشكل (٣): زهرة نبات السوسن الذهبي



الشكل (٤): زهرة نبات السوسن الألماني





المياماس– السويداء



درعا



المياماس– السويداء

الشكل (٥): مواقع الجولات الحقلية التي تم القيام بها.

3-3 طرائق البحث Research Methods:

٣-٣-١ التكاثر الخضري الدقيق Micropropagation :

يشمل التكاثر الخضري الدقيق على أربعة مراحل وهي: الزراعة الأولية، الإكثار والإستطالة، التجذير، والتقسية.

1-1-3-3 مرحلة الزراعة الأولية:

تهدف مرحلة الزراعة الأولية إلى الحصول على عينات سليمة خالية من التلوث، ولها القدرة على النمو، وتتم الزراعة وفق الخطوات التالية:

1-1-1-3-3 تحضير الأوساط المغذية Media Preparation :

تم استخدام المحلول المعدني الكامل لموراشيج وسكوج MS (Murashige and Skooge, 1962) في جميع مراحل الزراعة ومحلول (Heller) عام ١٩٥٣ فقط في مرحلتي الإكثار والتجذير والموضح تركيبهما في الجدول (1). حضر الوسط المغذي بوضع كمية من الماء المقطر في دورق زجاجي على جهاز التسخين والتحريك المغناطيسي، وبعد ذلك أضيفت مكونات الوسط الأخرى من العناصر الكبرى والصغرى والفيتامينات والسكروز، وكان آخرها إضافة الهرمونات، ضبط PH الوسط على درجة 5.8 بإضافة قطرات من ماءات الصوديوم (NaOH) 1 N باستعمال جهاز PH meter وذلك قبل إضافة الآغار، ثم أضيفت كمية الآغار إلى المحلول وترك الوسط على جهاز التحريك والتسخين المغناطيسي حتى الذوبان التام للآغار على درجة الغليان. وزّع الوسط بعد ذلك عند درجة حرارة أعلى من ٧٠°م في أنابيب اختبار بحجم 2.5×20 سم بمعدل 12 مل من الوسط المغذي في كل أنبوب. وسدت الأنابيب بالقطن ثم بورق السيلوفان، وعقمت بعد ذلك في جهاز الأوتوكلاف Autoclave على حرارة 121°م وتحت ضغط 1.04 كغ/سم2 لمدة 20 دقيقة. ويوضح الجدول (٢) الأوساط المغذية المستخدمة في تجارب البحث المختلفة.

الجدول (1): التركيب الكيميائي للمحلول المعدني لموراشيج وسكوغ (MS) ومحلول Heller المستخدم في التجارب المنفذة خلال مراحل النمو المختلفة حسب (Auge *et al.*,1984)

المحلول المعدني من العناصر الصغرى والكبرى	التركيب الكيميائي	MS (مغ/ل)	Heller (مغ/ل)
نترات الأمونيوم	NH_4NO_3	1650	
نترات البوتاسيوم	KNO_3	1900	
كلوريد الكالسيوم المائي	$CaCl_2.2H_2O$	440	٧٥
سلفات المغنزيوم المائية	$MgSO_4.7H_2O$	370	٢٥٠
كلور البوتاسيوم	KCl		750
فوسفات البوتاسيوم	KH_2PO_4	170	
نترات الصوديوم	$NANO_3$		600
فوسفات الصوديوم المائية	$NAH_2PO_4.H_2O$		125
سلفات الحديد المائية	$FeSO_4.7H_2O$	27.85	
شلات الصوديوم	Na_2EDTA	37.25	
سلفات المنغنيز المائية	$MnSO_4.4H_2O$	22.3	0.1
كلور الألمنيوم	$AlCl_3$		0.03
سلفات الزنك	$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	1
كلور النيكل المائي	$NICL_2.6H_2O$		0.03
حمض البوريك	H_3BO_3	6.2	1
يود البوتاسيوم	KI	0.83	0.01
موليبيدات الصوديوم المائية	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	
سلفات النحاس المائية	$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.03
كلور الحديدي المائي	$FeCl_3.6H_2O$		1
كلور الكوبالت المائي	$CoCl_2.6H_2O$	0.025	

الجدول (٢): الأوساط المغذية المستخدمة في التجارب المنفذة خلال مراحل النمو المختلفة

مكونات الوسط المغذي	مرحلة الزراعة الأولية	مرحلة الإكثار والاستطالة	مرحلة التجذير
المحلول المعدني	MS	MS ,1/2 MS,1/3MS Heller,1/2Heller,1/3Heller	MS ,1/2 MS,1/3MS Heller,1/2Heller,1/3Heller
السكروز	٣٠ غ/ل	٣٠ غ/ل	30غ/ل
الآغار	٧ غ/ل	٧ غ/ل	٧ غ/ل
ثيامين	١ مغ/ل	١ مغ/ل	١ مغ/ل
ميواينوسيتول (B8)	١٠٠ مغ/ل	١٠٠ مغ/ل	١٠٠ مغ/ل
منظمات النمو			
BAP	٢ مغ/ل	٠، ١، 3 ، 5 ، 10 مغ/ل	٠ مغ/ل
IBA	٠.٢ مغ/ل	0.1 مغ/ل	0 , 0.1 , 0.2 , 0.5 , 1 , 3 , 5مغ/ل
مواد أخرى			
فحم نشط	٣ غ/ل	–	–

2-1-1-3-3 تحضير الخزعات النباتية وتعقيمها Surface disinfection of Explants

تم استخدام عدة مصادر للعينات النباتية عند الزراعة الأولية لنباتات السوسن البري (من الريزومات، من قواعد الاوراق). تم تحضير العينات الريزومية بقص أفرع النبات الهوائية وكل الجذور (الدرنية والخيطية) الموجودة على الريزومات، ثم قسمت الريزومات إلى قطع بطول حوالي ٢ سم. بعد ذلك غسلت الريزومات تحت الماء الجاري لفترات زمنية مختلفة، مع إضافة قليل من مسحوق الغسيل كمادة ناشرة لإزالة الأتربة والأوساخ العالقة. ثم عوملت العينات النباتية بمواد التعقيم المختلفة وبتراكيز مختلفة بهدف التوصل إلى أفضل طريقة للتعقيم، مع إضافة مادة Tween 20 بمعدل قطرة واحدة لكل 100 مل من وسط التعقيم كمادة ناشرة لزيادة تماس سطح الأجزاء النباتية مع مادة التعقيم.

تظهر عدة مشاكل أساسية في طور الزراعة الأولية مثل التلوث وخاصة بأن الأجزاء المستخدمة في الزراعة تنمو تحت الأرض (ريزومات). وضمن هذا السياق تم تنفيذ عدة تجارب

لتعقيم العينات النباتية وطبقت في نوع السوسن الذهبي لتوفر المادة النباتية بشكل أكبر من السوسن الأسود، وبعد وضع التقنية المناسبة طبقت على السوسن الأسود. استخدمت مواد تعقيم مختلفة وبتراكيز وأزمنة مختلفة وقد تمت عملية التعقيم تحت جهاز العزل الجرثومي (Laminar flow).

بالنسبة للسوسن الذهبي تم استخدام البراعم الريزومية وقواعد الأوراق التي تم غسلها بالماء الجاري مع مسحوق تنظيف لمدة ٥٠ دقيقة لإزالة ماهو عالق عليها من غبار، أحياء مجهرية وأتربة ثم غمرت بالكحول تركيز 70% مدة 1 دقيقة عوملت بعد ذلك بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم بتراكيز مختلفة (١.٥، ٢، ٣ %) مدة ٣٠ دقيقة، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات بفاصل زمني 5 دقائق حيث تمت عملية التطهير السطحي تحت جهاز العزل الجرثومي. تم تحضير محلول التعقيم باستخدام الكلوروكس التجاري (تركيز هيبوكلوريت الصوديوم ٥.٢٥%) وذلك بحساب الكمية المطلوبة لكل تركيز، ومن ثم تكملة الحجم بالماء المقطر والمعقم إلى ١ ليتر.

كما ظهرت مشكلة الإسمرار في طور الزراعة الأولية وهو تأكسد المواد الفينولية المفرزة وبكميات كبيرة جدا من سطح الأنسجة النباتية، والتي تجعل الوسط مسمرا، وتعتبر هذه المواد عاملا محددا لنمو الأنسجة النباتية، ولذلك لا بد من التغلب عليها ومنع إفرازها، ولتحقيق هذا الغرض وتخفيف المشكلة تم زراعة الخزعات النباتية في وسط MS يحوي نصف تركيز أملاح نترات الأمونيوم و المضاف له ٣ مغ/ل فحم نشط.

3-3-1-1-3 عزل الخزعات النباتية وزراعتها Isolation and Cultivation of Explants :

تم عزل العينات الريزومية من الريزومات التي سبق تعقيمها بطول 3-5 مم تحت جهاز العزل الجرثومي، كما تم عزل قواعد الأوراق بطول ٣ مم وزرعت في وسط الزراعة الأولية كما هو موضح بالجدول (٢).

3-3-1-1-4 وضع الخزعات النباتية المزروعة في غرفة النمو:

تم تحضين العينات النباتية المزروعة في غرفة النمو في درجة حرارة ٢٢ ْم وإضاءة 16 ساعة/8 ظلام، وشدة ضوئية ٢٠٠٠ لوكس.

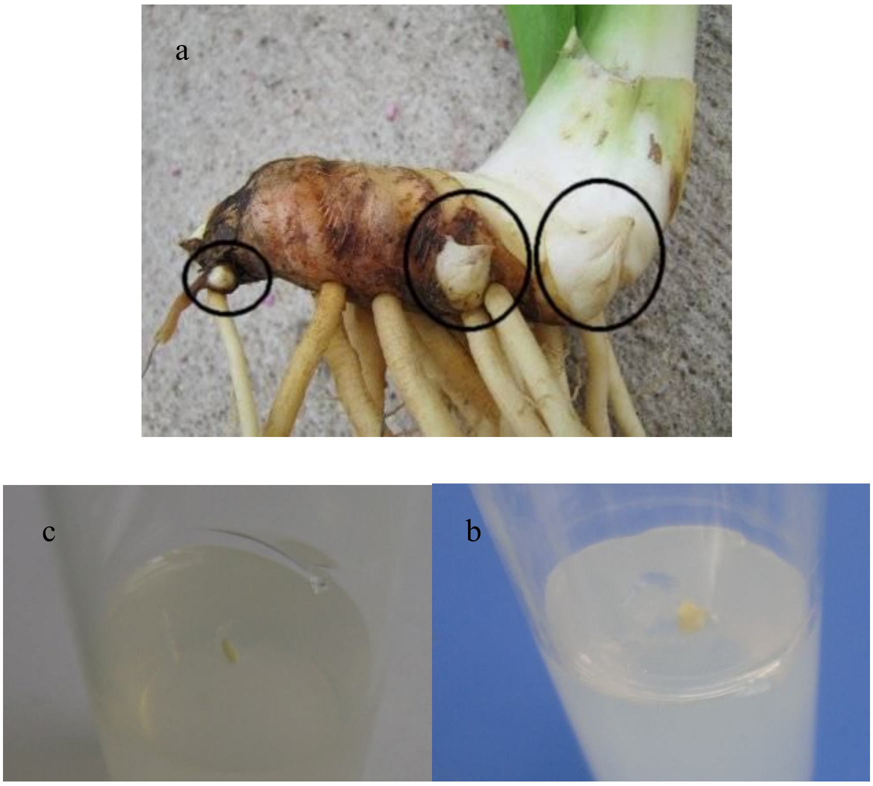
5-1-1-3-3 مصدر الخزعات النباتية المزروعة

تم أخذ الخزعات النباتية من :

١- براعم ريزومية بطول ٣-٥ مم.

٢- قواعد ورقية ريزومية بطول ٢-٣ مم كما هو موضح في الشكل (٦).

زرعت في الوسط المغذي الخاص بالزراعة الأولية والموضح تركيبه في الجدول (٢)، كما تم زراعة 20 عينة من كل نوع من العينات المدروسة على وسط الزراعة الأولية، وكـررت كـل تجربة مرتين وبنفس الشروط.



الشكل (٦): مصدر الخزعات النباتية المزروعة

a- ريزوم أرضي لنبات السوسن البري
b- برعم ريزومي
c- قاعدة ورقة

أما بالنسبة للصفات المدروسة في مرحلة الزراعة الأولية تم احتساب نسبة العينات السليمة، نسبة الإسمرار، نسبة العينات النامية.

العينات السليمة% = عدد العينات السليمة × ١٠٠ / عدد العينات المزروعة الكلي.

نسبة الإسمرار % = عدد العينات المسمرة × ١٠٠ / عدد العينات المزروعة الكلي.

نسبة العينات النامية% = عدد العينات النامية × ١٠٠ / عدد العينات المزروعة الكلي.

2-1-3-3 مرحلة الإكثار والاستطالة:

تهدف مرحلة الإكثار إلى الحصول على أكبر عدد ممكن من النموات الخضرية جيدة النمو، لذا تم في البداية نقل جميع أنواع العينات النامية (براعم ريزومية وقواعد الأوراق مجتمعة دون الفصل بينها) والناتجة عن مرحلة الزراعة الأولية ثلاث مرات في وسط مغذي يحوي المحلول المعدني الكامل لموراشيج وسكوج باستثناء نترات الأمونيوم فكانت نصف التركيز، مضافا له (1مغ/ ل من الثيامين + 100 مغ/ل ميواينوسيتول + 30غ/ل سكروز + 7غ/ل آجار-آجار+ ٥ مغ/ل BAP +0.1 مغ/ل IBA)، ثم وضعت في غرفة النمو على حرارة 22 ± ٢°م و إضاءة 16 ساعة يومياً بشدة 3000 لوكس.

1-2-1-3-3 دراسة تأثير تراكيز مختلفة من السيتوكينين BAP في إكثار نبات السوسن الأسود:

تمت دراسة تأثير تراكيز مختلفة من السيتوكينين BAP (0، 1، 3، 5، 10 مغ/ل) باستخدام المحلول المعدني الكامل لموراشيج وسكوج (MS) باستثناء نترات الأمونيوم فكانت نصف التركيز، ومضافا له (1مغ/ل ثيامين + 100 مغ/ل ميواينوسيتول + 30غ/ل سكروز+ 7غ/ل آجار- آجار +0.1 مغ/ل IBA).

كررت كل معاملة مرتين بحيث احتوى كل مكرر على 20 عينة نباتية جيدة النمو مأخوذة من النموات الناتجة عن البراعم الريزومية وقواعد الأوراق. سجل معدل الإكثار ومتوسط استطالة النموات بعد 30 يوم من الزراعة، حيث تم حساب متوسط تجربتين.

2-2-1-3-3 دراسة تأثير المحاليل المعدنية المستخدمة في إكثار نبات السوسن الأسود:

تم اختبار نوعين من المحاليل المعدنية MS و Heller (Heller, 1953)، بثلاث تراكيز مختلفة لكل منهما (كامل، 1/2، 1/3)، مضافاً لهما (0.1 مغ/ل IBA + 5 مغ/ل BAP +1 مغ/ل ثيامين + 100 مغ/ل ميواينوسيتول + 30غ/ل سكروز + 7غ/ل آجار- آجار).

كررت كل معاملة مرتين بحيث احتوى كل مكرر على 20 عينة نباتية جيدة النمو مأخوذة من النموات الناتجة عن البراعم الريزومية وقواعد الأوراق. سجل معدل الإكثار ومتوسط استطالة النموات بعد 30 يوم من الزراعة، حيث تم حساب متوسط تجربتين.

3-3-1-2-3 دراسة تأثير عدد مرات النقل في إكثار نبات السوسن الأسود :

تم في هذه المرحلة نقل العينات النباتية النامية الجيدة النمو باستخدام المحلول المعدني الكامل لموراشيج وسكوج (MS) باستثناء نترات الأمونيوم فكانت نصف التركيز، مضافًا له1 (مغ/ل ثيامين+ 100 مغ/ل ميواينوسيتول + 30غ/ل سكروز + 7 غ/ل آجار- آجار+ 5 مغ/ل BAP + 0.1 مغ/ل IBA) ثمان مرات بمعدل مرة كل أربع أسابيع على وسط جديد يحوي نفس المكونات. كررت كل معاملة مرتين بحيث احتوى كل مكرر على 20 عينة نباتية جيدة النمو مأخوذة من النموات الناتجة عن البراعم الريزومية وقواعد الأوراق، كما تم تسجيل معدل الاكثار ومتوسط استطالة النموات بعد 30 يوم من الزراعة، حيث تم حساب متوسط تجربتين.

3-3-1-2-4 دراسة تأثير تركيز السيتوكينين BAP المستخدم في الوسط المغذي وعدد مرات النقل في متوسط عدد وطول النموات المتكونة لنبات السوسن الذهبي:

تم استخدام أربعة تراكيز مختلفة من BAP بالإضافة إلى الشاهد دون سيتوكينين وهي: ١، ٣، ٥، ١٠. تمت عملية النقل للعينات النباتية المزروعة في أوساط الإكثار الحاوية على التراكيز المختلفة من BAP ثلاث مرات بمعدل مرة كل 4 أسابيع على وسط جديد يحوي نفس المكونات. سجل معدل الإكثار ومتوسط استطالة النموات بشكل دوري بعد ٣٠ يوم من النقل على نفس الوسط، وتم حساب متوسط النقلات الثلاث، وفي كل نقلة كررت كل معاملة مرتين بحيث احتوى كل مكرر على ٢٠ عينة نباتية (أنبوب).

أما بالنسبة للصفات المدروسة تم احتساب معدل الإكثار، متوسط استطالة النموات مع ملاحظة نوعية النموات المتكونة.

معدل الإكثار = مجموع عدد النموات الكلية المتكونة في كل العينات / عدد العينات النامية.

متوسط استطالة النموات = مجموع استطالة النموات المتكونة في كل العينات/عدد العينات النامية.

3-3-1-3 مرحلة التجذير:

في هذه المرحلة نقلت النموات الخضرية الحاوية على براعم ريزومية ونموات خضرية من وسط الإكثار إلى وسط التجذير باستخدام المحلول المعدني الكامل لموراشيج وسكوج (MS) باستثناء نترات الأمونيوم فكانت نصف التركيز، ومضافا له (1مغ/ل ثيامين + 100 مغ/ل ميواينوسيتول + 30غ/ل سكروز + 7 غ/ل آجار- آجار).

3-3-1-3-1 دراسة تأثير تركيز الأوكسين المستخدم في وسط التجذير لنبات السوسن الأسود والذهبي:

تم استخدام عدة تراكيز مختلفة من الأوكسين IBA : 0 , 0.1 , 0.2 , 0.5 , 1 , 3 ,5 مـغ/ل. باستخدام المحلول المعدني الكامل لموراشيج وسكوج (MS) باستثناء نترات الأمونيوم فكانت نصف التركيز، ومضافا له (1مغ/ل ثيامين + 100 مغ/ل ميوانيوسيتول + 30غ/ل سكروز+ 7غ/ل آجار– آجار). كررت كل معاملة مرتين بحيث احتوى كل مكرر على 20 عينة نباتية. سجلت النسبة المئوية للتجذير، متوسط عدد الجذور ومتوسط استطالة الجذور بعد 30 يوم من الزراعة، حيث تم حساب متوسط تجربتين.

3-3-1-3-2 دراسة تأثير نوع وتركيز المحاليل المعدنية المستخدمة في مرحلة التجذير للسوسن الأسود:

تم اختبار نوعين من المحاليل المعدنية MS و Heller، بثلاث تراكيز مختلفة لكل منهما (كامل، 1/3 1/2)، مضافأ لهما (٣ مغ/ل IBA +1 مغ/ل ثيامين+ 100مغ/ل ميوانيوسيتول +30 غ/ل سكروز + 7 غ/ل آجار– آجار). كررت كل معاملة مرتين بحيث احتوى كل مكرر على 20 عينة نباتية. سجلت النسبة المئوية للتجذير، متوسط عدد الجذور ومتوسط استطالة الجذور بعد 30 يوم من الزراعة، حيث تم حساب متوسط تجربتين.

نسبة التجذير % = عدد النموات المجذرة × ١٠٠/ عدد النموات الكلية المنقولة لمرحلة التجذير

متوسط عدد الجذور المتكونة = مجموع عدد الجذور المتكونة في كل النموات / عدد النموات المجذرة

متوسط استطالة الجذور = مجموع استطالة الجذور المتكونة في كل النموات/ عدد النموات المجذرة

3-3-1-4 مرحلة التقسية:

تم غسل جذور النبيتات المجذرة بالماء المقطر المعقم بهدف التخلص من الآجار العالق بها، ثم نقعت في ماء مقطر معقم مضاف له مبيد فطري جهازي بتركيز0.5 مل/ل لمدة 10 دقائق، تم بعد ذلك نقلها إلى أصص بلاستيكية قطر٨ سم تحوي بيتموس معقم (تم تعقيمه في الأوتوكلاف على حرارة ١٢١ ْم لمدة 15 دقيقة) إلى مستوى ثلثي الأصيص. حيث تم إحداث حفرة صغيرة في منتصف الأصيص وإنزال جذور النباتات بداخلها ثم إحاطة هذه الجذور بالتورب، كما تم سقاية النباتات مباشرة بعد ذلك بمحلول ¼ MS، وتغطيتها بقوارير زجاجية معقمة وتركت تحت ظروف غرفة النمو (حرارة ٢٢ ْم وإضاءة 16 ساعة) مدة 10 أيام مع تقديم الخدمات اللازمة من ري وتسميد، حيث تم سقاية النباتات مرة أسبوعياً بوسط ¼ MS مع معاملتها بالمبيد الفطري بمعدل مرة كل أسبوعين، ثم أزيل الغطاء بشكل تدريجي، وأخيراً نقلت النباتات إلى البيت البلاستيكي بعد

عمليات الأقلمة بهدف متابعة نموها وزرعت في وسط مؤلف من (تراب، نشارة خشب، تورب، ستيريوبور) بنسب متماثلة لكل منها.

تم تنفيذ ثلاثة تجارب بحيث احتوى كل مكرر على ٢٠ نبيتة . تم حساب نسبة نجاح النبيتات في عملية الأقلمة ، ومتوسط استطالة النباتات المقساة من السوسن البري بعد شهرين من عملية التقسية.

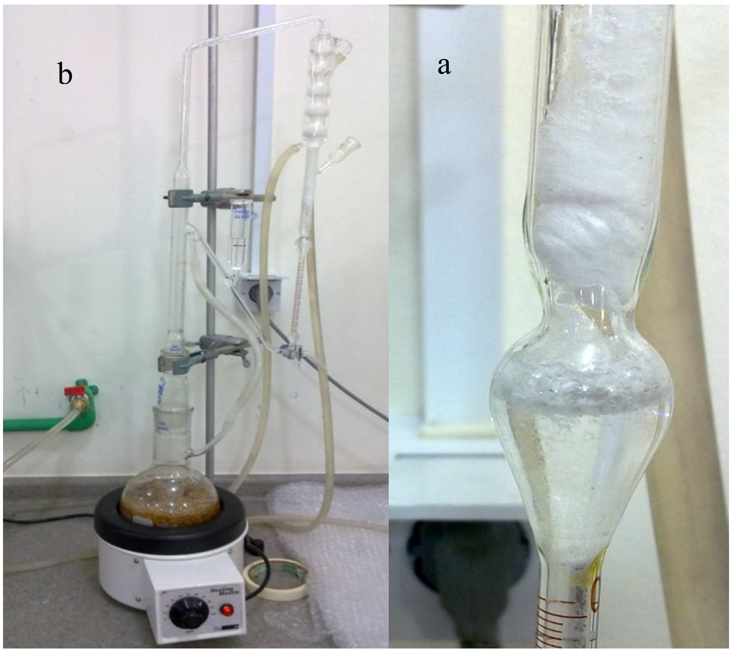
نسبة نجاح عملية التقسية % = عدد النباتات الناجحة بعملية التقسية × ١٠٠ / عدد النباتات المنقولة لمرحلة التقسية.

متوسط استطالة النباتات = مجموع استطالة الأفرع النامية / عدد الأفرع للنباتات الناجحة بعملية التقسية.

٣-3-٢ التحاليل الكيميائية:

٣-3-٢-١ استخلاص الزيت الأساسي:

تم تقطير(٢٠٠ غ) من ريزومات أنواع السوسن المختلفة (الألماني، الأسود، الذهبي) باستخدام جهاز استخلاص الزيوت العطرية كما هو موضح في الشكل (٧) لمدة ٥-٦ ساعات، تم تخزين الزيت حتى يتم إجراء التحاليل الكيميائية المتعلقة باستخدام جهاز GC-MS.



الشكل (٧) : عملية تقطير نباتات السوسن

a : طبيعة الزيت الناتج عن التقطير، b : جهاز استخلاص الزيوت العطرية

٣-3-٢-٢ الكشف عن وجود المركبات الكيميائية في الزيت الأساسي باستخدام جهازGC-MS.

تم حقن عينات الزيت باستخدام تقنيـــة GC-MS، ذي المواصـــفات التاليـــة GC 7890A وMS 5975C (Agilent technologies, Palo Alto,CA,USA)، الشكل (٨).

العامود: نوعه وحشوته HP-5MS (5% diphenyl/ 95% dimethylsiloxane)

طوله: ٣٠ م.

سماكة الطبقة المغلفة: ٠.٢٥ ميكرومتر.

القطر الداخلي للعمود: ٠.٣٢ مم.

كما كانت درجة حرارة الحاقن: ٢٥٠ °م و نسبة التجزئة: ٨٠ ml/min.

الضغط : ٥.١٨٤٣ psi، الغاز الناقل: الهيليوم، أما تدفق الغاز الحامل: 84 ml/min.

البرنامج الحراري: تم ضبط درجة الحرارة عند ٦٠ °م لمدة ٤ دقائق ثم تم رفعها بالمعدلات التالية:

من ٦٠ °م حتى ٦٤ °م بمعدل درجة مئوية واحدة/دقيقة.

من ٦٤ °م وحتى ١٥٥ ْم بمعدل ٢.٥ °م /دقيقة.

من ١٥٥ °م وحتى ٢٥٠ °م بمعدل ٥ °م /دقيقة.

وبذلك كان الزمن الإجمالي للبرنامج ٦٣.٤ دقيقة.

تم التعرف على المركبات عن طريق مقارنة زمن الإحتباس النسبي ومطياف الكتلة (MS) ببيانات المركبات الموجودة في مكتبة WNo 8 ومكتبة NIST .



الشكل (٨) : جهاز الكروماتوغرافيا الغازية GC-MS

3-٤ التحليل الإحصائي Statistical Analysis:

تم التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS وتحليل Univariate و Multivariate على مستوى معنوية ٩٩ %.

في مرحلتي الزراعة الأولية والإكثار: استخدم التصميم العشوائي البسيط (Completely Randomized Design) واستخدم تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (Completely Randomized Block Design).

في مرحلتي التجذير والتقسية: استخدم تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (Completely Randomized Block Design).

أما بالنسبة للتحاليل الكيميائية:

١- أجريت جميع التجارب على ثلاث مكررات وسجلت النتائج كمتوسط ± الإنحراف المعياري.

٢- أجري اختبار تحليل التباين Anova باستخدام تحليل General Linear Model بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة وتبعت باختبار Tukey لتحديد الفروق المعنوية بين المتوسطات على مستوى ثقة ٩٥% ($P \leq 0.05$).

٣- أجري التحليل الإحصائي باستخدام برنامج Minitab 14.

الفصل الرابع: النتائج والمناقشة

RESULTS AND DISCUSSION

4- النتائج والمناقشة:

٤-١ الإكثار الخضري الدقيق:

٤-١-١ مرحلة الزراعة الأولية:

٤-١-١-١ تأثير عملية التعقيم السطحي للأجزاء النباتية:

تعد عملية التعقيم السطحي من أهم الخطوات التي يعتمد عليها نجاح أو فشل الزراعة النسيجية، يتوقف نجاح هذه العملية على عدة عوامل هي: الوقت اللازم للتعقيم، نوع وتركيز المادة المستخدمة في التعقيم، والجزء النباتي المراد تعقيمه، لذلك تم إجراء عدة تجارب بهدف الحصول على أفضل طريقة تعقيم ليتم اعتمادها لاحقاً. وقد زرعت العينات النباتية في هذه المرحلة في وسط الزراعة المعتمد في مرحلة الزراعة الأولية جدول (٢).

بالنسبة للعينات الريزومية المأخوذة من السوسن الذهبي (براعم ريزومية وقواعد الاوراق) فقد تم استخدام هيبوكلوريت الصوديوم بتراكيز مختلفة ١.٥ و ٢ و ٣ % ولمدة 30 دقيقة، كما هو موضح في الجدول (٣).

تبين النتائج الموضحة في الجدول (٣) بأن زيادة تركيز هيبوكلوريت الصوديوم أدت إلى زيادة نسبة العينات السليمة التي بلغت أقصاها (٤٠.٤%) باستخدام التركيز٣%، والذي تفوق معنويا على التراكيز الأخرى المستخدمة بالنسبة لنوعي العزلات المستخدمة، أما التراكيز الأعلى من ذلك أدت إلى تهتكات وموت قسم من العزلات التي تم تعقيمها وهذا يخالف ما تم التوصل إليه من قبل Gozu وآخرون عام ١٩٩٣ عندما استخدم هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز ٥% لمدة ٢٠ دقيقة لتعقيم القطع الريزومية التي تحوي قواعد أوراق النوع *Iris pallida* .

الجدول (٣): تأثير تركيز هيبوكلوريت الصوديوم في تعقيم خزعات السوسن الذهبي

الجزء النباتي المزروع / هيبوكلوريت الصوديوم%	الخزعات السليمة %		تأثير تركيز هيبوكلوريت الصوديوم
	البراعم الريزومية	قواعد الأوراق	
١.٥	8 [c]	14.3 [c]	**11.15 [c]**
2	17.2 [c]	30 [b]	**23.6 [b]**
٣	32..3 [b]	48.5 [a]	**40.4 [a]**
تأثير الجزء النباتي المزروع	**19.17 [b]**	**30.93 [a]**	*24.83*
LSD ١ %	تأثير الجزء النباتي المزروع		6.66
	تأثير تركيز هيبوكلوريت الصوديوم		8.16
	تأثير الجزء النباتي المزروع x تأثير تركيز هيبوكلوريت الصوديوم		11.54

– أخذت النتائج بعد ١٠ أيام من الزراعة، والنتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين. (تحليل Univariate باستخدام برنامج SPSSعلى مستوى ثقة ١%). تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

كذلك تفوقت قواعد الأوراق معنوياً على البراعم الريزومية في النسبة المئوية للعينات السليمة وذلك وفقاً للمتوسط العام (30.93% و19.17 % على التوالي). كما يلاحظ من الجدول أن أعلى نسبة عينات سليمة (٤٨.٥ %) تم الحصول عليها من قواعد الأوراق عند استخدام هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز ٣ %، بينما أقل نسبة عينات سليمة (٨%) تم الحصول عليها من البراعم الريزومية عند استخدام التركيز ١.٥ % من هيبوكلوريت الصوديوم. وتوافقت النتائج التي تم الحصول عليها مع أعمال Yabuya وآخرون عام١٩٩١ حيث استخدموا هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز ٣% لمدة ١٠ دقائق لتعقيم السيقان الزهرية الفتية للنوع *Iris ensata* Thunb .

عموما يكون التلوث في الريزومات كبيرا، إذ وجد أن العزلات المأخوذة من الريزومات تتلوث بشكل كبير ومتكرر (Ichihashi and Kato, 1986)، كما يصعب التأسيس لزراعات خالية من التلوث تماما باستخدام الريزومات (Islam *et al*., 2004; Loc *et al*., 2005) .

٤-١-١-٢ الحد من ظاهرة الإسمرار:

تبين النتائج في الجدول (٤) و الشكلين (٩ و١٠) تفوق البراعم الريزومية معنوياً على قواعد الأوراق في النسبة المئوية للإسمرار (٢٩.٣٤%، ٦٣.١٤% على التوالي)، كما يلاحظ عدم وجود فروق معنوية على مستوى الأنواع النباتية.

أدى إضافة الفحم النشط إلى الوسط الغذائي إلى إنخفاض ملحوظ في الإسمرار، وبدء تحريض

تشجيع النمو بدرجة معينة (الشكل، ١١). تعود التأثيرات الفعالة للفحم النشط إلى عدة عوامل وهي: إدمصاص المركبات الفينولية المثبطة للنمو، إدمصاص هرمونات النمو النباتية والمركبات العضوية الأخرى، وتحسين التهوية لوسط الزراعة (المعري، ١٩٩٥ ;Van Waes, 1987).

بينت النتائج التي حصلنا عليها أن استخدام وسط MS بنصف تركيز أملاح نترات الأمونيوم وتقليل تركيز الهرمونات النباتية المستخدمة، بالإضافة إلى عملية النقل المتكرر وعلى فترات قصيرة أثبتت فاعلية في الحد من ظاهرة الإسمرار مقارنة بوسط MS الكامل، ويمكن أن يعزى ذلك الى أن زيادة تركيز NH_4^+ في الوسط المغذي يعمل على زيادة حموضة الوسط المغذي والذي يرافقه إنخفاض واضح في امتصاص عنصر K وهذا يؤثر بشكل مباشر في زيادة إفراز المركبات الفينولية في الوسط المغذي (Maene,1986)، كما أن زيادة تركيز الهرمونات النباتية مثل الأوكسينات وBAP يزيد بشكل واضح من ظهور المركبات الفينولية (Pierik, 1987).

ويعزى معظم الباحثين سبب الاسمرار الحاصل في الأجزاء النباتية المقطوعة وبالتالي الوسط الملامس لها إلى أكسدة الفينولات المتعددة التي تصبح نتيجة قطع الأجزاء النباتية بتماس مع أنزيمات الأكسدة وتتحول هذه المركبات الفينولية إلى كوينونات ذات السمية العالية للنبات. ويلاحظ ظهور الاسمرار حيث يتدرج اللون من الأصفر إلى البني الغامق و الأسود (المعري، ١٩٩٥).

بين Kaushal وزملاؤه عام ٢٠٠٥ أن لحجم العزلة النباتية تأثيرا في النسبة المئوية للاسمرار وللعينات النامية، حيث انخفضت النسبة المئوية للإسمرار وزادت نسبة بقاء العينات (أكبر من ٦٠%) عندما تم استخدام البراعم الجانبية التي يتراوح حجمها بين ٠.٢ – ٠.٦ سم مقارنة مع البراعم الأكبر.

الجدول (٤): تأثير مصدر الخزعات النباتية المزروعة في النسبة المئوية لإسمرار السوسن البري

النوع النباتي/ الجزء النباتي المزروع	السوسن الأسود	السوسن الذهبي	تأثير الجزء النباتي المزروع
براعم ريزومية	33.6 [b]	25.08 [b]	**29.34** [a]
قواعد أوراق	61.58 [a]	64.7 [a]	**63.14** [b]
تأثير الأنواع النباتية	**47.59** [a]	**44.89** [a]	***46.24***
LSD 1%	تأثير الأنواع النباتية		9.1
	تأثير الجزء النباتي المزروع		13.11
	تأثير الأنواع × الجزء النباتي المزروع		18.53

– أخذت النتائج بعد ١٠ أيام من الزراعة، والنتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين (تحليل Univariate باستخدام برنامج SPSS على مستوى ثقة ١%) . تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات

نفذت عدة تجارب أولية لحل مشكلة الاسمرار في السوسن وقد تم الحصول على أفضل نتيجة باستخدام وسط مغذي يحوي الفحم النشط بتركيز ٣غ/ل الذي أدى بشكل واضح إلى خفض نسبة الاسمرار بشكل كبير شكل (١١).

تم اقتراح عدة إجراءات لحل مشكلة اسمرار الخلايا في النخيل منها معاملة الأجزاء النباتية بمواد مضادة للأكسدة أو بإضافة هذه المواد إلى الوسط المغذي كاستخدام مزيج من حمض الأسكوربيك وحمض السيتريك داخل الوسط أو إضافة الفحم النشط الذي يعمل على امتصاص المركبات الفينولية المفرزة كما يمكن استخدام عزلات صغيرة، بالإضافة لعملية النقل المتكرر إلى وسط جديد وعلى فترات قصيرة (المعري، ١٩٩٥ ; Zaid, 1984).





الشكل (٩) : اسمرار الخزعات النباتية المزروعة

a : الاسمرار الناتج عن البرعم الريزومي b : الاسمرار الناتج عن قاعدة أوراق

٤-١-١-٣ استجابة الخزع النباتية المستخدمة للزراعة التأسيسية :

تم في هذا البحث اختبار أجزاء نباتية مختلفة في قدرتها على النمو، حيث زرعت العينات المختلفة في وسط مغذي خاص بالزراعة الأولية كما هو موضح في الجدول (٢).

يبين الجدول (5) و الشكل (١٠) تفوق البراعم الريزومية معنوياً من حيث النسبة المئوية للعينات النامية (٣٥.٧٦%) على قواعد الأوراق (١٨.٣١ %)، ولم يلاحظ فروق معنوية على مستوى الأنواع النباتية.

الجدول (5): إختلاف الإستجابة للنمو باختلاف الخزع النباتية المزروعة لنبات السوسن البري.

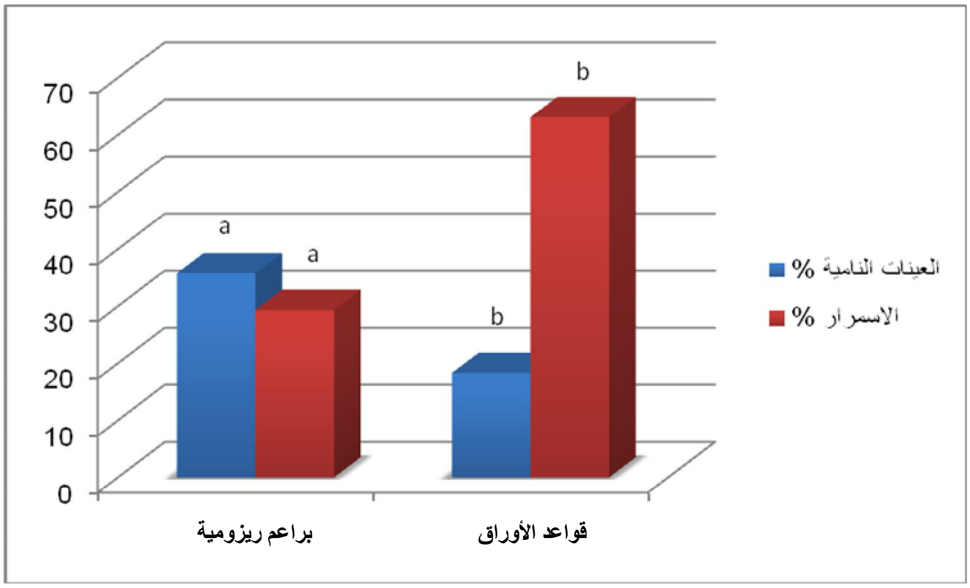
النوع النباتي/ الجزء النباتي المزروع	السوسن الأسود	السوسن الذهبي	تأثير الجزء النباتي المزروع
براعم ريزومية	٣٧.٤٢ [a]	34.11 [a]	**35.76** [a]
قواعد أوراق	١٩.٠٠ [b]	١٧.٦٢ [b]	**18.31** [b]
تأثير الأنواع النباتية	**28.2** [a]	**25.86** [a]	*27.03*
LSD 1%	تأثير الأنواع النباتية		4.1
	تأثير الجزء النباتي المزروع		5.13
	تأثير الأنواع × الجزء النباتي المزروع		7.26

– أخذت النتائج بعد ١٠ أيام من الزراعة، والنتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين (تحليل Univariate باستخدام برنامج SPSS على مستوى ثقة ١%). الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

يؤثر نوع العزلة النباتية في استجابتها للنمو، بحيث لا تستجيب جميع الأعضاء النباتية المزروعة بنفس الدرجة (Hartmann *et al.*,1997). تبين أن البراعم الريزومية القمية أعطت أسرع استجابة وأعلى معدل إكثار لنبات الزنجبيل (Hiremath,2006)، كما بين Aftab وزملائه عام ٢٠٠٨ عندما قام باستخدام ثلاث عزلات من نبات الغلاديول أن الكورمات الصغيرة أو الثانوية أعطت أفضل استجابة للنمو (٩٠%)، بالمقارنة مع العزلات الأخرى (الميرستيمات، الأوراق).

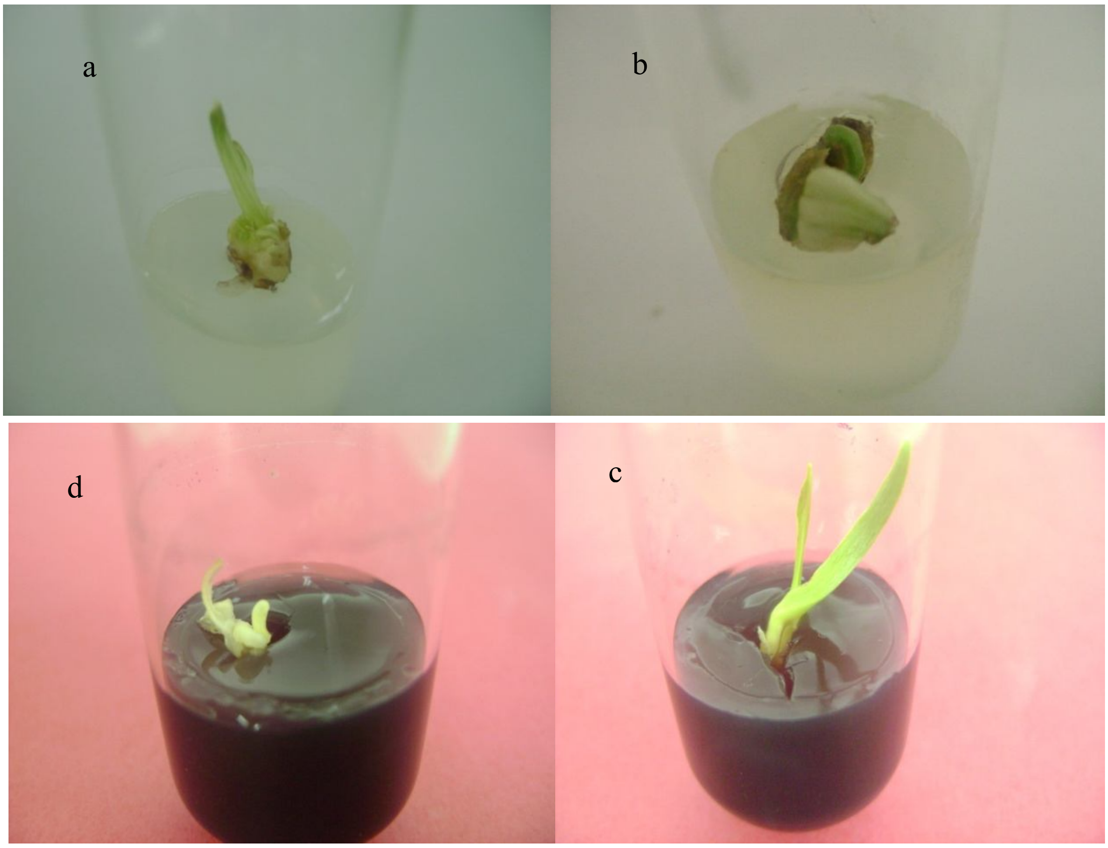
تعود أسباب الإختلاف في الاستجابة باختلاف العزلات النباتية إلى التغيرات الحاصلة في الحالة الفسيولوجية (Sreelatha *et al.*,1998)، كما يعود إلى حقيقة أن البراعم الريزومية تحوي مناطق ميرستيمية كاملة ذات قدرة على الإنقسام والنمو (Hartmann *et al.*,1997).

نتيجة لعملية البحث التي قمنا بها وجدنا أن معظم الدراسات التي أجريت بغرض إكثار نبات السوسن مخبريا تمت بطرق غير مباشرة (كالس)، بالإضافة إلى دراسات لإكثاره بشكل مباشر باستخدام عزلات مختلفة، إلا أننا لم نجد أي دراسة لإكثار نبات السوسن بشكل مباشر باستخدام البراعم الريزومية.



الشكل (١٠) إختلاف الإستجابة للنمو والاسمرار باختلاف الخزع النباتية المزروعة لنبات السوسن الأسود والذهبي تبعا للمتوسط العام.

يلاحظ من الشكل (١٠) أن أعلى نسبة عينات نامية سجلت عند استخدام البراعم الريزومية مقارنة باستخدام قواعد الأوراق، كما تفوقت البراعم الريزومية على قواعد الأوراق من حيث النسبة المئوية للاسمرار.



الشكل (١١) : مصدر الخزعات النباتية المأخوذة في مرحلة الزراعة الأولية

a: نمو ناتج عن برعم ريزومي في وسط بدون فحم　　b : نمو ناتج عن قاعدة ورقة في وسط بدون فحم

c : نمو ناتج عن برعم ريزومي في وسط يحوي ٣ مغ/ل فحم منشط.

d : نمو ناتج عن قاعدة أوراق في وسط يحوي ٣ مغ/ل فحم منشط.

٤-١-٢ مرحلة الإكثار والإستطالة Multiplication and elongation stage:

يهدف طور الإكثار والإستطالة الحصول على أكبر عدد من النموات الخضرية جيدة النمو والخالية من الشفافية . نقلت النموات الخضرية المتكونة في نهاية طور الزراعة الأولية (براعم ريزومية وقواعد الأوراق مجتمعة دون الفصل بينها) إلى وسط الإكثار بهدف زيادة عدد النموات المتكونة، والحصول على عدد كاف من النموات الخضرية بهدف الإكثار ودراسة بعض العوامل المؤثرة فيه.

حيث تم استخدام وسط مغذي يحوي المحلول المعدني الكامل لموراشيج وسكوج باستثناء نترات الأمونيوم فكانت نصف التركيز، مع إضافة منظمات النمو (٠.١ مغ/ل IBA) بالإضافة إلى الفيتامينات ومصادر الطاقة والآغار المستخدمة في وسط الزراعة الأولية كما هو موضح

بالجدول(٢)، تم في هذه المرحلة دراسة تأثير تركيز السيتوكينين BAP وعدد مرات النقل ونوع المحلول المعدني وتركيزه في معدل الإكثار ومتوسط طول النموات الخضرية الناتجة.

٤-١-٢-١ دراسة تأثير تراكيز مختلفة من السيتوكينين BAP في معدل إكثار ومتوسط استطالة السوسن الأسود

يلاحظ من الجدول (6) أن استخدام السيتوكينين في وسط الإكثار أدى لزيادة معدل الإكثار بالمقارنة مع الشاهد دون سيتوكينين الذي سجل أقل معدل إكثار(٥.٠٨ نمو خضري)، بينما حقق استخدام التركيز ٥ مغ/ل من BAP أعلى معدل إكثار (13.63) وبفروق معنوية مع الشاهد، كما هو موضح في الشكل (a ,١٣)، في حين أن إضافة السيتوكينين إلى الوسط أدى إلى انخفاض في متوسط استطالة النموات وقد حقق الشاهد دون سيتوكينين أعلى قيمة لها (6.75 سم) وبدون وجود فروق معنوية مع التراكيز ١و٣ مغ/ل (٥.٣٦، ٤.٧٣ سم على التوالي).

الجدول (6) : تأثير تراكيز مختلفة من السيتوكنين BAP في معدل إكثار واستطالة نبات السوسن الأسود

تركيز السيتوكينين (مغ/ل) BAP	معدل الاكثار(نمو خضري)	متوسط استطالة النموات(سم)
0	5.08 c	6.75 a
1	7.8 bc	5.36 ab
3	6.58 c	3.72 b
5	13.63 a	4.73 ab
10	10.73 ab	4.47 b
LSD 1%	3.14	2.05

- أخذت النتائج بعد 30 يوم من الزراعة على محلول الإكثار، والنتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين حيث كررت كل عملية نقل مرتين و بمعدل ٢٠ مكرر (أنبوب) لكل عملية نقل . الأحرف المتشابهة في العمود الواحد تشير إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

تم الحصول على أعلى معدل إكثار عند استخدام المحلول المعدني MS مضافا له 5 مغ/ل من BAP وذلك بالنسبة لكل من نباتات *Curcuma aromatica* (Sanghamitra, 2000)، والغلاديول التابع للفصيلة السوسنية (Grewel *et al*., 1995) وهذا يتوافق مع ما تم التوصل إليه في هذه التجربة.

قام Fujin وآخرون عام 1971 بدراسة تأثير منظمات النمو في تشكل البراعم العرضية من البراعم الجانبية المأخوذة من حراشف أبصال (*Iris hollandica*) ووجد أن أكبر تشكل

للبراعم العرضية كان بإضافة 8 مغ/ل أدنين + 1 مغ/ل NAA +1 مغ/ل BA ويعود الإختلاف مع النتائج التي توصلنا لها إلى الإختلاف الوراثي بين الأنواع النباتية حيث يختلف تأثير السيتوكينين بحسب النوع المستخدم، طريقة الزراعة، مصدر العزلة وحالة النبات الأم.

تشير الدراسات المرجعية إلى أن تطور الأفرع العرضية من أجزاء السوسن الزهرية يتطلب وجود BA في وسط النمو (Boltenkov and Zarembo, 2005)، كما أن إكثار الريزومات تطلب وجود السيتوكينين في الوسط، و أن غياب السيتوكينين أعطى أقل تفرع (Khaleghi *et al*., 2008) وهذا يوافق ما تم التوصل إليه في نتائج هذا البحث.

تم استخدام هرمون BA على نطاق واسع لإكثار الأجناس التابعة للفصيلة السوسنية (Koetle, 2009)، مثل السوسن الهولندي (Hussey, 1976)، أنواع الغلاديول (Dantu and Bhojwani, 1995)، الأنواع التابعة لجنس *Babiana* (McAlister *et al*., 1998) والأنواع التابعة لجنس *Watsonia* (Ascough *et al*., 2007).

تعد الأوكسينات والسيتوكينينات من منظمات النمو الأكثر أهمية في زراعة الأنسجة النباتية، بشكل عام يحد السيتوكينين من السيادة القمية ويشجع نمو البراعم الجانبية مما يؤدي إلى زيادة التفرعات الجانبية المتكونة (George *et al*., 2008 ; المعري، ١٩٩٥)، وذلك نتيجة وجود شق الأدنين الذي له دور هام في تحفيز نمو النبات وزيادة معدل الإكثار. وبالرغم من إنتاج السيتوكينينات بشكل داخلي في النباتات الكاملة إلا أن العديد من الأنسجة والأعضاء الصغيرة المزروعة مخبريا غير قادرة على تصنيع كاف لها من أجل دفع النمو ولهذا يطلب تحقيق توازن في نسبة إضافة السيتوكينين / الأوكسين لتنظيم معدل الإكثار (Srivastava, 2002)، ولتنظيم انقسام الخلايا بحيث أن الخلايا لا تدخل بطور الميتوز مالم يتواجد السيتوكينين (George *et al*., 2008).

إن لإضافة الأوكسين في مرحلة الإكثار بتركيز منخفض له دور هام وفعال فهو مطلوب للنمو الأولي للميرستيمات وعزلات قمم الأفرع، وينشط استطالة الخلايا عن طريق زيادة تدفق البروتينات. من المعروف فيزيولوجياً أن الأوكسين له دور مباشر في الإنقسام الخلوي والإستطالة الخلوية حيث يترافق تأثيره مع حدوث تعديلات في النظام الأسموزي الخلوي ومن المفترض أن الأوكسين يزيد من الجهد الأسموزي والنفاذية الخلوية وكذلك يزيد من معدل تكوين البروتينات (Rossignol *et al*., 1990).

٤-١-٢-٢ **تأثير التركيب المعدني للمحلول المستخدم في إكثار واستطالة السوسن الأسود:**

توضح النتائج في الجدول (7) و الشكلين (١٢ و ١٣) تفوق المحلول المعدني MS معنويا بكافة التراكيز المستخدمة (كامل، 1/2، 1/3) في معدل الاكثار ومتوسط استطالة النموات على كافة تراكيز المحلول المعدني Heller.

أثناء المقارنة ببين قوة كل من أملاح Heller (1953) وMS لوحظ إختلاف بنوعية النتروجين الموجود الذي كان بشكل NH_4NO_3 في وسط MS و$NaN0_3$ في وسط Heller، كما يتباين المحلولان المغذيان عن بعضهما بمستوى الأمونيوم (George *et al*., 2008). يعود ذلك إلى انخفاض تركيز العناصر المغذية في وسط Heller وإلى انعدام وجود بعضها بالمقارنة مع وسط MS ذي التراكيز العالية نسبياً.

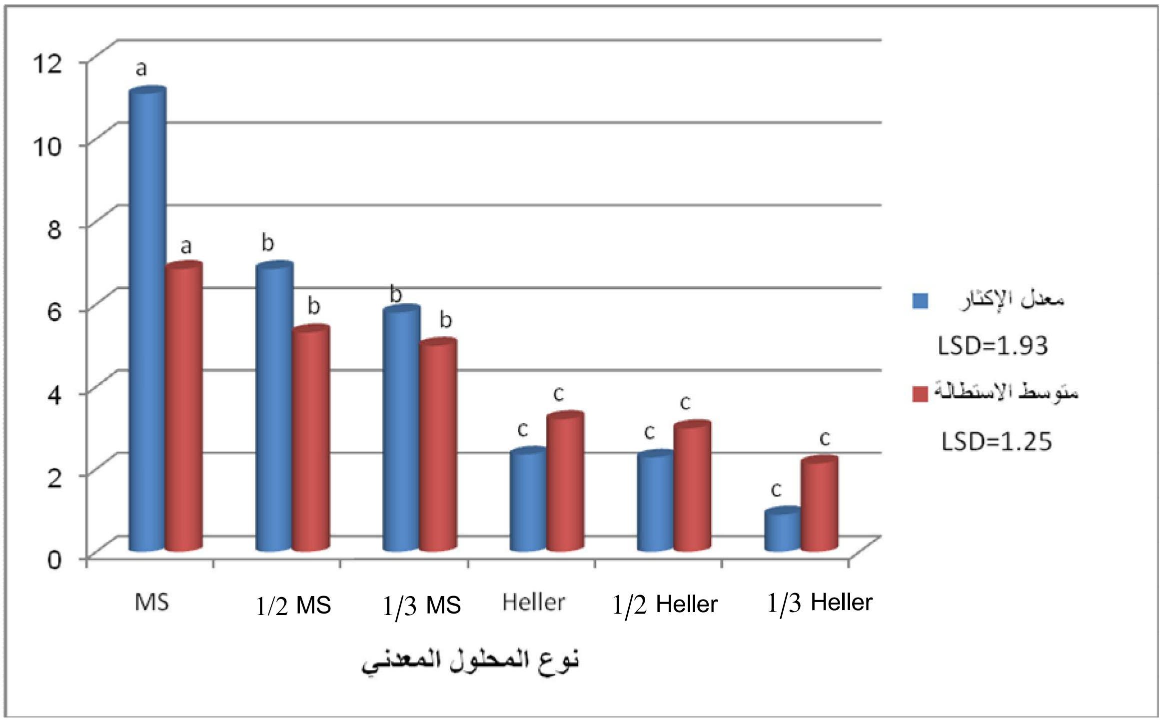
تمت ملاحظة أن المحلول المعدني MS أعطى أعلى معدل إكثار (١١.٠٨)، وأعلى متوسط استطالة (٦.٨٥ سم) وبفروق معنوية بالمقارنة مع باقي التراكيز المستخدمة منه (1/2MS و1/3MS) الشكل (١٢). هذا يخالف ما تم التوصل اليه من أن وسط (1/2MS) أعطى أعلى معدل إكثار لحراشف أبصال السوسن الهولندي (Van der Lind and Hol,1988) والصنف *Iris ensata* Okichidori (Yabuya *et al*.,1991).

الجدول (7): تأثير نوع وتركيز المحاليل المعدنية المستخدمة في معدل الإكثار ومتوسط استطالة النموات.

نوع المحلول المعدني	MS	1/2MS	1/3MS	Heller	1/2Heller	1/3Heller	LSD 1%
معدل الاكثار	11.08 a	6.85 b	5.8 b	2.35c	2.28c	0.9 c	1.93
متوسط طول النموات	6.85 a	5.31 b	5b	3.21c	3c	2.13 c	1.25

- أخذت النتائج بعد 30 يوم من الزراعة على محلول الإكثار، والنتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين حيث كررت كل عملية نقل مرتين وبمعدل ٢٠ مكرر (أنبوب) لكل عملية نقل . تشير الأحرف المتشابهة في السطر الواحد إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات .

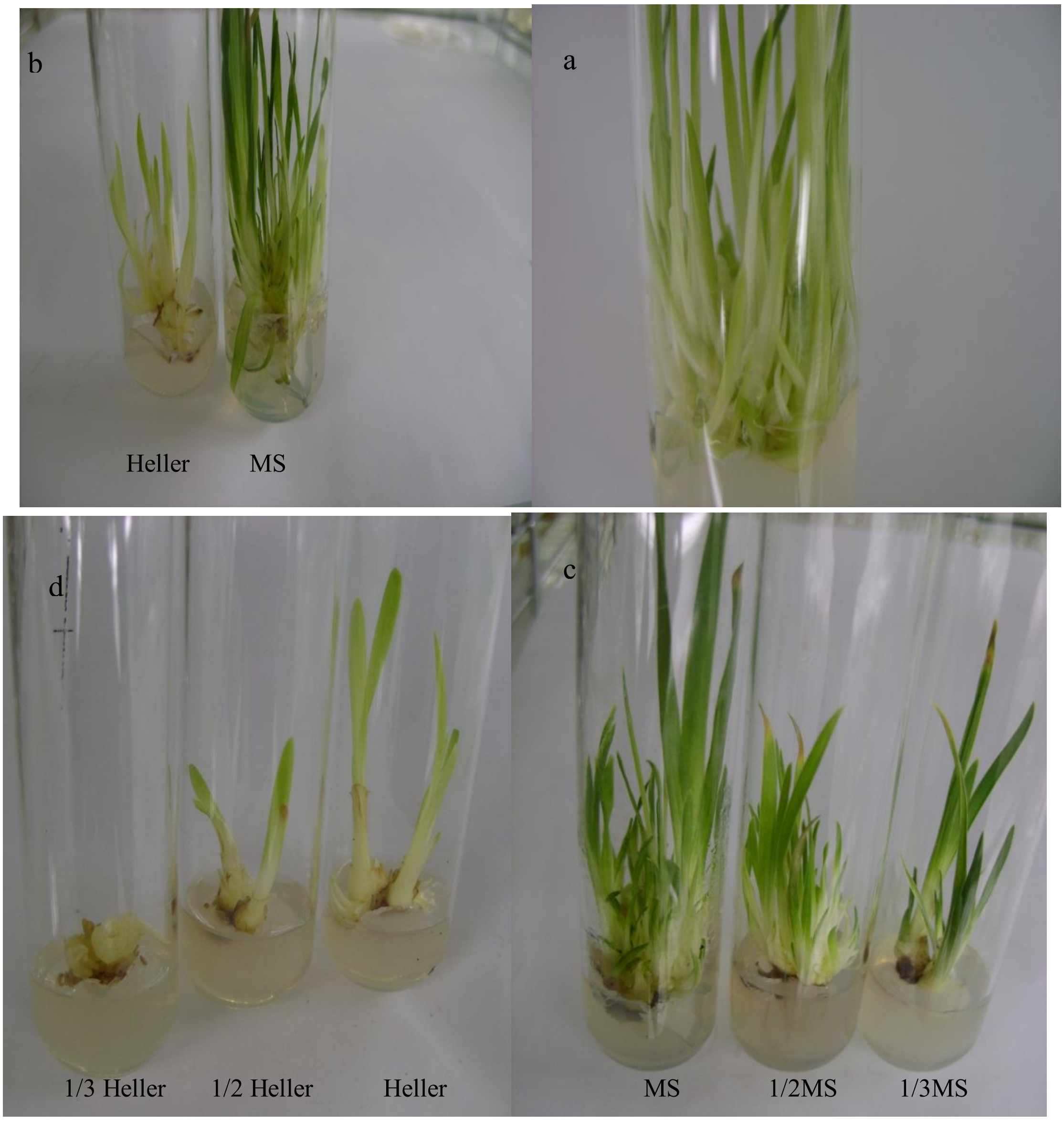
كما ذكر Quoirin وLepoivre عام ١٩٧٧ أن المواد المضافة من قبل Heller كالـ Al^{+3} و Ni^{+2} كانت معيقة للنمو في التراكيز العالية منها. بالإضافة إلى احتواءه على تراكيز منخفضة من الأملاح المعدنية بالمقارنة مع محلول MS.



الشكل (١٢) : معدل الإكثار ومتوسط استطالة النموات باختلاف نوع وتركيز المحلول المعدني في السوسن الأسود.

كما يلاحظ من الشكل (١٢) أن زيادة تركيز المحلول المعدني سواء كـــان MS أو Heller أدى إلى زيادة معدل الإكثار ومتوسط الاستطالة، حيث كانت الفروق معنوية بين MS وكـــلا مـــن 1/2MS و1/3MS بالنسبة لمعدل الإكثار ومتوسط استطالة النموات الشـــكل (١٣، d وc). ربمـــا يعود ذلك إلى انخفاض تركيز العناصر المغذية في محلول 1/2MS و1/3MS وخاصـــة أن جميـــع المحاليل تحتوي على نفس هرمونات النمو والمكونات الأخرى.

بين Parra وAmo-Marco عام ١٩٩٦ أن الوسط 1/4MS أعطى أعلى معـــدل إكثـــار لنبات الريحان *Myrtus communis* عندما قاما بدراسة تأثير الأوساط المغذيـــة: MS وHeller بتراكيز مختلفة لكل منهما (كامل، ½، ¼).



الشكل (١٣) : عدد وطول النموات الناتجة في مرحلة الإكثار للسوسن الأسود.

a :عند استخدام الوسط MS مضافا إليه 5 مغ/ل BAP + ٠.١ مغ/ل IBA

b : أوساط MS و Heller عند استحدام التركيز ٥ مغ/ل BAP

c و d : أوساط MS و Heller بثلاث تراكيز مختلفة لكل منهما (كامل، 1/2 1/3) .

٤-١-٢-٣ تأثير عدد مرات النقل في معدل الإكثار واستطالة العينات النباتية في السوسن الأسود:

سجلت النتائج بعد 30 يوماً من كل عملية نقل جديدة ولمدة ثمان مرات (Subcultures).

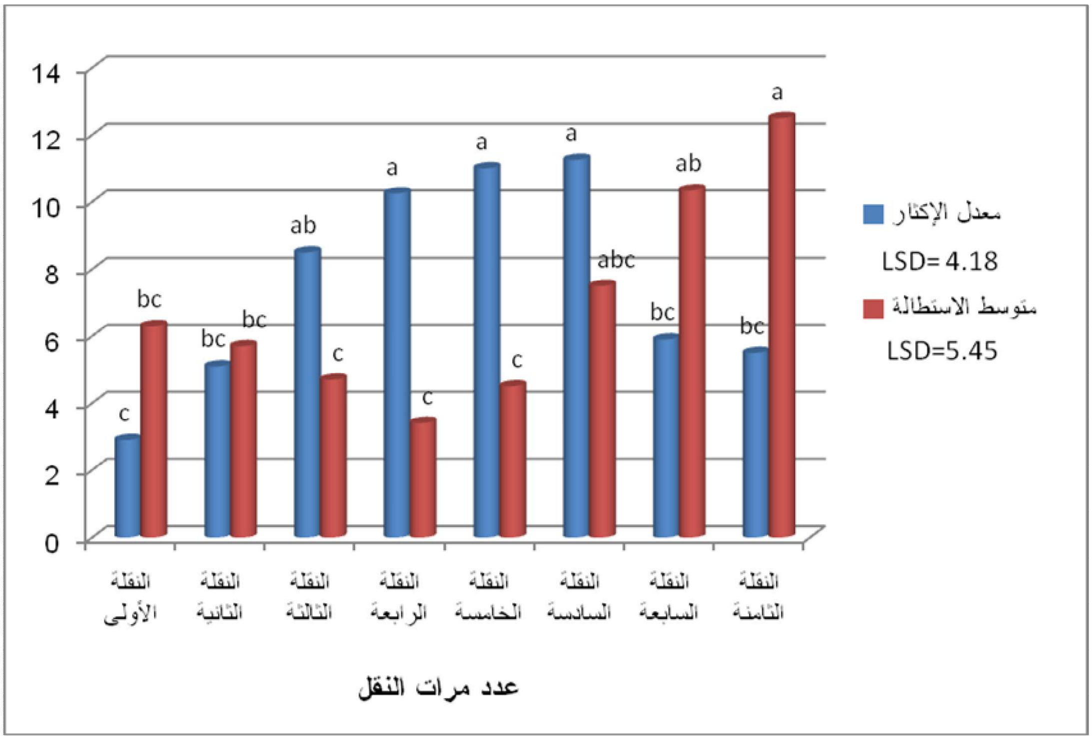
يوضح الجدول (8) والشكل (١٤) أن زيادة عدد مرات النقل تعمل على زيادة عدد النموات واستطالتها فقد أظهرت النتائج زيادة معدل الإكثار حتى النقلة الثانوية السادسة كما تبين وجود فروقاً معنوية في معدلات الإكثار بين النقل الأول ووكل من النقل الثالث والرابع والخامس والسادس (2.9، 8.5، ١٠.٢٥،11، 11.25 على التوالي)، في حين لم تظهر أي فروقات معنوية بين النقل الرابع والخامس والسادس (١٠.٢٥، 11، 11.25).

جدول (8): تأثير عدد مرات النقل في معدل الإكثار(نمو خضري) ومتوسط استطالة العينات النباتية (سم).

عدد مرات النقل	النقلة الاولى	النقلة الثانية	النقلة الثالثة	النقلة الرابعة	النقلة الخامسة	النقلة السادسة	النقلة السابعة	النقلة الثامنة	LSD 1%
معدل الاكثار	2.9 [c]	5.1 [bc]	8.5 [ab]	10.25 [a]	11 [a]	11.25 [a]	5.9 [bc]	5.5 [bc]	٤.١٨
متوسط طول النموات(سم)	6.3 [bc]	5.7 [bc]	4.7 [c]	3.4 [c]	4.5 [c]	7.5 [abc]	10.34 [ab]	12.5 [a]	٥.٤٥

- أخذت النتائج بشكل دوري بعد ٣٠ يوم من الزراعة الثانوية على نفس الوسط، والنتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين حيث كررت كل عملية نقل مرتين و بمعدل ٢٠ مكرر (أنبوب) لكل عملية نقل.
- الأحرف المتشابهة في السطر الواحد تشير إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

إن الزيادة في عدد النموات نتيجة للزراعة وإعادتها قد يعود إلى تأقلم العينات النباتية على شروط الزراعة المخبرية واكتسابها صفات العينات النباتية الفتية (rejuvention) التي تمر بها الأجزاء النباتية والتي تعمل على تركيز الهرمونات المنشطة للنمو مما يؤدي الى زيادة عدد النموات المتكونة حيث ذكر بأن الزراعة وإعادتها حسنت من عدد نموات وعدد جذور الكمثرى الشائعة (*pyrus communis*) للصنف Williams (AL -Maarri *et al*., 1994). كما بينت دراسة أخرى على نباتات الجيربيرا وفيلدندرون أن تكرار مرات النقل أدت الى زيادة عدد النموات الجديدة حتى الزراعة الثانوية السادسة (Vardja and Vardja, 2001) وهذا موافق لما تم التوصل إليه في نتائج هذا البحث. إن تكرار عملية نقل النبيتات وعلى نفس الوسط أدت إلى زيادة معدل الإكثار ومتوسط الاستطالة (القضاة، ٢٠٠٨ ؛ الموسى، ٢٠١٠).



الشكل (١٤): معدل الإكثار ومتوسط استطالة النموات بتكرار عدد مرات النقل لنبات السوسن الأسود.

يبين الشكل (١٤) انخفاض متوسط استطالة النموات كلما ازدادت عدد مرات النقل حتى النقل الرابع ثم نلاحظ ارتفاع متوسط استطالة النموات بتكرار الزراعة الثانوية ويمكن أن يعزى ذلك حسب ما أشار Norton و Norton عام 1986 عندما قاما بالنقل المتكرر للأنواع التزينية التابعة للفصيلة الوردية Rosaceae إلى: أسباب وراثية أو تغيرات حاصلة نتيجة الجريان المتكرر من السيتوكينين والعناصر المغذية والسكروز أو زوال التقلبات البيئية الموسمية.

٤-١-٢-٤ تأثير تركيز BAP المستخدم في الوسط المغذي وعدد مرات النقل في معدل الإكثار والاستطالة لنبات السوسن الذهبي:

استخدم في هذه التجربة عدة تراكيز مختلفة من السيتوكينين BAP (1-3-5-10مغ/ل) بالإضافة إلى الشاهد دون سيتوكينين.

أ. **في معدل الإكثار:**

يلاحظ من الجدول (9) أن استخدام السيتوكينين في وسط الإكثار أدى لزيادة معدل الإكثار وبفروق معنوية بالمقارنة مع الشاهد دون سيتوكينين الذي سجل أقل معدل إكثار (1.25)، بينما حقق استخدام التركيز ٣ مغ/ل من BAP أعلى معدل إكثار(٣.٤٣) كما في الشكل (١٥). هذا يوافق ما تم التوصل إليه من قبل Hussain وزملائه عام ٢٠٠١ من أن أفضل معدل إكثار في نبات الغلاديول تم عند إضافة ٣ مغ/ل من الهرمون IBA. كذلك الأمر بالنسبة لنبات الكركم (Balchandran *et al.,* 1990; Dipti *et al*., 2005).

كما تبين بأن استخدام التراكيز المنخفضة من السيتوكينين BAP (١ و٣ مغ/ل) أعطى معدلات إكثار مرتفعة (2.61 و ٣.٤٣ على التوالي) مقارنةً بالتراكيز العالية التي أدت إلى خفض معدل الإكثار حيث بلغ ٢.٤٦ عند استخدام التركيز ١٠ مغ/ل. وهذا يوافق ما تم التوصل إليه من قبل Aftab وزملائه عام ٢٠٠٨ من أن زيادة تركيز BAP أدى إلى إنخفاض معدل إكثار نبات الغلاديول. تبين النتائج الموضحة في الجدول (٩) بأن تكرار عملية النقل للنبيتات على نفس الوسط أدت إلى زيادة معدل الإكثار حتى النقل الثالث الذي حقق أعلى معدل إكثار (٤.٢٨) وتفوق بذلك معنوياً على باقي النقلات. ويلاحظ من الجدول أيضاً بأن أعلى متوسط لعدد النموات المتكونة كان ٦.٣٨، وذلك عند النقل الثالث إلى وسط يحوي ٣ مغ/ل BAP، بينما سجل أقل عدد للنموات المتكونة (٠.٩) عند النقل الأول على وسط الشاهد دون سيتوكينين.

الجدول (9): تأثير التراكيز المختلفة من BAP وعدد مرات النقل في معدل إكثار السوسن الذهبي

عدد مرات النقل/ تركيز BAP (مغ/ل)	1	2	3	معدل الإكثار
0	0.9	1.62	1.22	**1.25** [c]
١	1.12	1.08	5.633	**2.61** [a b]
3	1.5	2.42	6.38	**3.43** [a]
5	1.25	1.33	4.68	**2.42** [b]
10	1.67	2.25	3.47	**2.٤٦** [a b]
تأثير عدد مرات النقل	**1.29** [b]	**1.74** [b]	**4.28** [a]	*2.42*
LSD ١ %	تأثير عدد مرات النقل			0.76
	تأثير التركيز			0.98
	تأثير عدد مرات النقل × التركيز			1.04

- أخذت النتائج بشكل دوري بعد ٣٠ يوم من الزراعة الثانوية على نفس الوسط، والنتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين حيث كررت كل عملية نقل مرتين و بمعدل ٢٠ مكرر (أنبوب) لكل عملية نقل(تحليل Univariate باستخدام برنامج SPSS على مستوى ثقة ١%). تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

ب. متوسط استطالة النموات:

تبين النتائج في الجدول (10) أن استخدام السيتوكينين في وسط الإكثار أدى إلى إنخفاض في متوسط طول النموات الناتجة، حيث تفوق الشاهد الذي سجل أفضل استطالة (٦.٧٦ سم) كما هو موضح في الشكل (15,a)، وربما يعود ذلك لكون التراكيز العالية من السيتوكينين تؤدي لتشكيل أفرع كثيرة وقصيرة تفشل بالاستطالة. حققت المعاملة بالتركيز ١٠ مغ/ل أقل متوسط استطالة وهذا يوافق ما تم التوصل إليه من قبل Hiremath وزملاؤه عام ٢٠٠٦ أن الأفرع كانت وحيدة وأعطت أعلى متوسط استطالة في وسط الشاهد بالنسبة لنبات الزنجبيل وهذا يعود إلى السيادة القمية.

كما لوحظ زيادة تدريجية في متوسط استطالة النموات بتكرار عملية نقل النبيتات على نفس الوسط ووجد أن النقل الثالث حقق أعلى متوسط استطالة (٦.٩٣ سم) وتفوق بذلك معنوياً على النقل الأول الذي سجل أدنى متوسط طول للنموات الناتجة (4.48 سم).

الجدول (10) : تأثير عدد مرات النقل في متوسط استطالة السوسن الذهبي :

عدد مرات النقل/ تركيز BAP (مغ/ل)	النقلة الأولى	النقلة الثانية	النقلة الثالثة	متوسط الاستطالة
0	5.63	6.6	8.04	**6.76** [a]
1	5.65	4.98	5.36	**5.33** [b]
3	4.28	7.51	7.73	**6.51** [a]
5	3.75	5.6	6.6	**5.31** [b]
10	3.09	5.63	6.93	**5.22** [b]
تأثير عدد مرات النقل	**4.48** [b]	**6.06** [a]	**6.93** [a]	***5.83***
LSD ١ %	تأثير عدد مرات النقل			1.23
	تأثير التركيز			0.6
	تأثير عدد مرات النقل × التركيز			2.75

- أخذت النتائج بشكل دوري بعد ٣٠ يوم من الزراعة الثانوية على نفس الوسط، والنتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين حيث كررت كل عملية نقل مرتين و بمعدل ٢٠ مكرر (أنبوب) لكل عملية نقل (تحليل Univariate باستخدام برنامج SPSS على مستوى ثقة ١%).
- تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

أما بالنسبة لتأثير التفاعل بين العوامل المدروسة، فقد أعطى الشاهد دون سيتوكينين استطالة أعظمية (8.04سم) عند النقل الثالث، بينما سجلت أدنى استطالة (3.09 سم) عند النقل الأول على وسط يحوي ١٠ مغ/ل من السيتوكينين BAP.

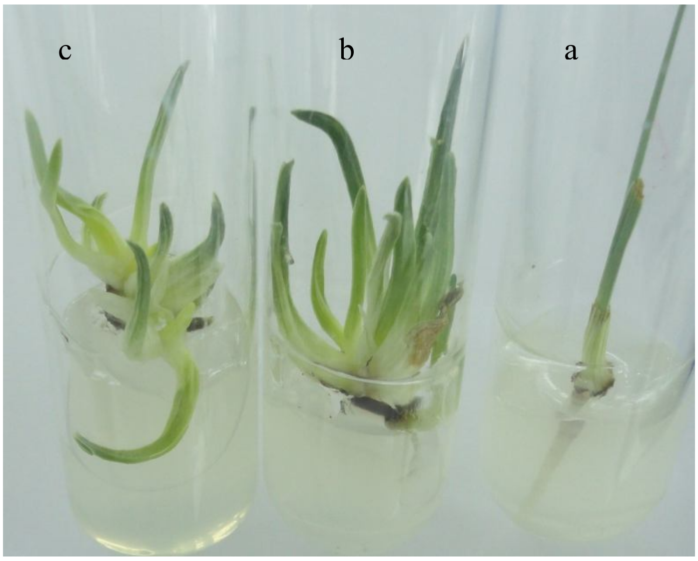
كما تبين لدينا أثناء المعاملة بتراكيز عالية من السيتوكينين (٥، ١٠ مغ/ل) ظهور نباتات مصابة بالشفافية وتزداد نسبة هذه النباتات بتكرار الزراعة الثانوية، وبزيادة تركيز السيتوكينين في الوسط.

إن المعاملة بالسيتوكينين تؤدي إلى زيادة معدل الإكثار كونها فعالة في الحد من السيادة القمية للأفرع إلا أن استخدام تركيز عالي جدا يؤدي إلى تشكل أفرع قصيرة غير منتظمة الشكل ومصابة بالشفافية، كما قد تفشل بالإستطالة و غير ملائمة للتجذير والنقل(George *et al.*, 2008).

يعود ذلك إلى أن السيتوكينينات تنشط النمو الخلوي الشعاعي أو القطري، وتثبط استطالة الخلايا الطولية. وهذه الظاهرة تلاحظ في زراعة الأنسجة النباتية حيث تقل استطالة النموات المتكونة بالأنسجة عند زيادة تركيز السيتوكينين (Thrope, 1981; Al Maarri *et al.*, 1986).

استخدمت مصطلح الشفافية (Vitrification) لوصف حالة التزجج في النسج والأعضاء النباتية المشوهة مورفولوجياً وفيزيولوجياً، والتي فقدت عملها الوظيفي، حيث تبدي الأفرع المصابة بالشفافية انخفاضاً واضحاً في معدل النمو، أما الأوراق فتصبح أكثر استطالة، مجعدة، وملتفة، وذات لون باهت ومظهرها هش يمكن كسرها بسهولة، وتكون أكثر سماكة وقساوة(Franket *et al.*,2004)كما ارتبط ظهورها بخصائص الخزعة النباتية، ووسط النمو خلال مرحلة الإكثار في المخبر (Budiarto, 2009)، وهناك الكثير من العوامل التي تؤدي إلى حدوث ظاهرة الشفافية كرد فعل تكيفي للنسج المعرضة لعدة اجهادات متزامنة مع بعضها أهمها ارتفاع تركيز الأمونيا في البيئة ومنظمات النمو المستخدمة في الوسط (السيتوكينات) (Meyer and Van Staden, 1988). يعد تركيز السيتوكينين المضاف إلى الوسط المغذي من أهم العوامل التي تؤثر في حدوث الشفافية حيث تشجع المستويات العالية للسيتوكينين على حدوث هذه الظاهرة، بينما تؤدي التراكيز المنخفضة إلى الإكثار الطبيعي للأفرع (George,1993; AlMaarri and Xie, 2010).

لقد بينت الدراسات السابقة بأن استخدام بنزيل أمينو بيورين BAP بشكل خاص قد شجع على ظهور الشفافية عند إكثار نباتات السالفيا حيث ارتفعت نسبتها بزيادة تركيزه (Hosoki and Tahare,1993)) وقد شوهد مرض الشفافية على كالس نبات النخيل وعزى سببه إلى زيادة تركيز الهرمونات في الوسط المغذي (المعري، ١٩٩٥)، كما تمكن (Squires *et al.*, 1991) من تخفيض نسبة الشفافية في أفرع نبات التبغ بتقليل تركيز BAP في البيئة.



الشكل (١٥): عدد وطول النموات الناتجة في مرحلة الإكثار للسوسن الذهبي.

a: في معاملة الشاهد دون سيتوكينين، b : عند استخدام التركيز 3 مغ/ل BAP
c : عند استخدام التركيز 1 مغ/ل BAP

٤-١-٣ مرحلة التجذير Rooting stage:

٤-١-٣-١ دراسة تأثير تراكيز مختلفة من أوكسين IBA في تجذير النموات الخضرية لنبات السوسن الأسود والذهبي:

استخدم في هذه التجربة ستة تراكيز من الأوكسين IBA في وسط التجذير وهي : ٠.١ و٠.٢ و٠.٥ و١ و٣ و٥ مغ/ل بالإضافة إلى الشاهد من دون أوكسين.

أ- النسبة المئوية للتجذير

توضح النتائج في الجدول (11) أن استخدام الأوكسين IBA أدى إلى زيادة النسبة المئوية للتجذير بالمقارنة مع الشاهد حيث سجلت أعلى نسبة مئوية للتجذير (89.25%) عند استخدام التركيز ٣ مغ/ل من IBA (الشكل، ١٦). وهذا يخالف ما تم التوصل إليه من قبل Yildirim عام ٢٠٠٧ أن استخدام ١ مغ/ل من IBA كان الأفضل في تشكل الجذور بالنسبة للزعفران *Crocus sativus* L. التابع للفصيلة السوسنية. كما أن استخدام التراكيز العالية (٥ مغ/ل IBA) أدى إلى نقص النسبة المئوية للتجذير(٧١.٦%).

يتبين من الجدول (١١) أيضاً تفوق السوسن الأسود معنوياً على السوسن الذهبي في النسبة المئوية للتجذير الذي بلغ (81.72 %و٦٦.٤٤ % على التوالي) وذلك حسب المتوسط العام. حيث يتباين تشكل الجذور العرضية بحسب التركيب الوراثي (Genotype) وطرق الزراعة (George *et al.*, 2008).

الجدول (11): دراسة تأثير تراكيز مختلفة من الأوكسين IBA في النسبة المئوية لتجذير السوسن البري :

النوع النباتي/ تركيز IBA (مغ/ل)	السوسن الأسود	السوسن الذهبي	نسبة التجذير%
0	٧٥	٣٠	**٥٢.٥** [b]
٠.١	٨٥.٤٤	٧٥	**80.22** [a]
٠.٢	٨٠.٠	٥٧.٥	**68.75** [ab]
٠.٥	٨٧.٥	٨٥	**86.25** [a]
١	٧٧.٥	٦٢.٥	**70** [ab]
٣	٩٠	٨٨.٥	**٨٩.٢٥** [a]
٥	٧٦.٦	٦٦.٦	**71.6** [ab]
تأثير الأنواع	**81.72** [a]	**66.44** [b]	***74.08***
LSD ١ %	تأثير الأنواع		11.83
	تأثير التركيز		20.5
	تأثير الأنواع × التركيز		28.98

- أخذت النتائج بعد ٣٠ يوم من الزراعة على وسط التجذير، والنتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين (تحليل Univariate باستخدام برنامج SPSS على مستوى ثقة ١%). تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.



الشكل (١٦) عدد وطول الجذور المتكونة في السوسن الأسود والذهبي .

a : عند استخدام التركيز ٣ مغ/ل IBA في السوسن الأسود، b : عند استخدام التركيز ٣ مغ/ل IBA في السوسن الذهبي

تختلف نسبة التجذير باختلاف الأصناف النباتية والهرمونات المستخدمة وتركيب الوسط الغذائي إذ يعد الإختيار الأمثل لنوع الأوكسين وتركيزه عاملاً هاماً في قدرة العينات النباتية على التجذير (Vuylsteke, 1989). كما وجد أن الأوكسين IBA أكثر فعالية من NAA (Kim *et al*., 2003).

وعند دراسة تأثير التفاعل بين العوامل المدروسة، نجد بأن استخدام التركيز ٣ مغ/ل من IBA أعطى أفضل نسبة مئوية للتجذير وصل الى ٩٠% في السوسن الأسود، مقابل ٣٠% للشاهد في السوسن الذهبي.

تستخدم الأوكسينات ضمن مجال واسع في زراعة الأنسجة النباتية، وتشكل عادة جزء مكمل للوسط الغذائي، حيث تحفز الأوكسينات تمايز الحزم الوعائية كما لها دور في تمايز البراعم و الجذور (Aloni, 2004). تعرف الأوكسينات بقدرتها على تشكل الجذور العرضية، كما أن المراحل المبكرة لتشكل الجذور تنظم أيضا من قبل الإنتقال القطبي للأوكسين. يستعمل هرمون IBA عموما بشكل كبير للحصول على التشكل أو الدفع الأولي للجذور (root initiaion)، ومن الهام اختيار التركيز المناسب من الأوكسين الذي يسمح بالنمو من دون ظهور كالس (George *et al*., 2008)، إذ يزداد عدد الجذور معنوياً بإضافة تراكيز منخفضة من الأوكسين

(Vuylsteke, 1989)، كما يؤدي استخدام الأوكسين بتراكيز عالية إلى زيادة إنتاج الإتيلين المثبط للنمو (George *et al*., 2008).

ويفضل في هذه المرحلة الزراعة في وسط خالي من السيتوكينين لتثبيط تكوين أفرع جديدة والحد من نمو البراعم الجانبية لتشجيع تكوين جذور جديدة، لأن استخدام التراكيز العالية من السيتوكينين يؤدي إلى إعاقة أو تأخير تشكل الجذور ونموها (مثبط للدفع الجذري) ولهذا السبب لا يضاف السيتوكينين عادة إلى وسط التجذير (Ben-Jaacov *et al*.,1991).

ب- متوسط عدد الجذور

تبين النتائج في الجدول (12) والشكل(١٧) أن استخدام الأوكسين أدى إلى زيادة عدد الجذور المتشكلة بالمقارنة مع الشاهد الذي حقق أقل عدد جذور (١.٠٩)، كما أن زيادة تركيز الأوكسين المستخدم أدى إلى زيادة عدد الجذور المتشكلة حيث بلغت ٣.٥٧ جذر عند استخدام التركيز ٣ مغ/ل من IBA. وهذا يخالف ما توصل إليه Hiremath عام ٢٠٠٦ من أن IBA بتركيز ١ مغ/ل أعطى أعلى متوسط لعدد جذور نبات الزنجبيل (*Zingiber officinale* Rosc).

يتبين أيضاً تفوق السوسن الذهبي على السوسن الأسود في عدد الجذور الذي بلغ (٢.٣٧ و٢.١٥ على التوالي) وذلك حسب المتوسط العام (الجدول، ١٢).

كما يلاحظ من الجدول أن أكبر عدد للجذور(٤.٤٧) تم الحصول عليه في وسط التجذير الذي يحوي ٣ مغ/ل وذلك في نبات السوسن الأسود، يليه (٤.٢٥) في الوسط الذي يحوي التركيز ٠.٥ مغ/ل بالنسبة للسوسن الذهبي، بينما تم الحصول على أقل عدد للجذور (١.٠٥) في السوسن الذهبي عند الزراعة في وسط الشاهد.

بالنسبة لنوعية الجذور تبين النتائج التي تم الحصول عليها أنها كانت ذات نوعية جيدة ورفيعة وطويلة في الوسط الحاوي على 0.1 و٠.٢ مغ/ل IBA، لكن بالمقابل نلاحظ زيادة في ثخانة الجذور بزيادة تركيز الهرمون في الوسط. عادة يتطلب استخدام تراكيز عالية من الأوكسين للتجذير، وتكون الجذور العرضية التي تتطور رفيعة، و يزداد ثخنها في الأوساط الحاوية على تراكيز عالية من الأوكسين أو بوجود مثبطات النمو (Roberts *et al*.,1992).

الجدول (12): دراسة تأثير تراكيز مختلفة من الأوكسين IBA في متوسط عدد الجذور في السوسن البري :

النوع النباتي/ تركيز IBA (مغ/ل)	السوسن الأسود	السوسن الذهبي	متوسط عدد الجذور
0	1.12	1.05	**1.09** [c]
٠.١	1.9	1.75	**1.83** [bc]
٠.٢	1.6	1.68	**1.64** [bc]
٠.٥	1.7	4.25	**2.98** [a b]
١	2.5	2.91	**2.71** [abc]
٣	4.47	2.67	**3.57** [a]
٥	1.75	2.25	**2** [abc]
تأثير الأنواع	**2.15** [a]	**2.37** [a]	***2.26***
LSD ١ %	تأثير الأنواع		0.64
	تأثير التركيز		1.7
	تأثير الأنواع × التركيز		1.7

- أخذت النتائج بعد ٣٠ يوم من الزراعة على وسط التجذير، والنتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين (تحليل Univariate باستخدام برنامج SPSS على مستوى ثقة ١%). الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

ج- متوسط طول الجذور

تبين النتائج في الجدول (13) و الشكل (١٧) تفوق الشاهد في متوسط استطالة الجذور المتشكلة (4.77 سم) وبفروق معنوية مع استخدام الأوكسين الذي أدى لانخفاض استطالة الجذور حيث تحققت أقل استطالة عند استخدام التركيز 5 مغ/ل من IBA (١.٥٤ سم)، ويعود السبب في ذلك لكون زيادة تركيز الأوكسين في الوسط المغذي يعمل على تثبيط استطالة الجذور المتكونة.

هذا يوافق ما تم التوصل إليه من أن استخدام وسط الشاهد من دون أوكسين أعطى أعلى متوسط استطالة لجذور نبات *Sisyrinchium laxum* التابع للفصيلة السوسنية (Ascough *et al*., 2011) ولجذور نبات الزنجبيل (Hiremath, 2006).

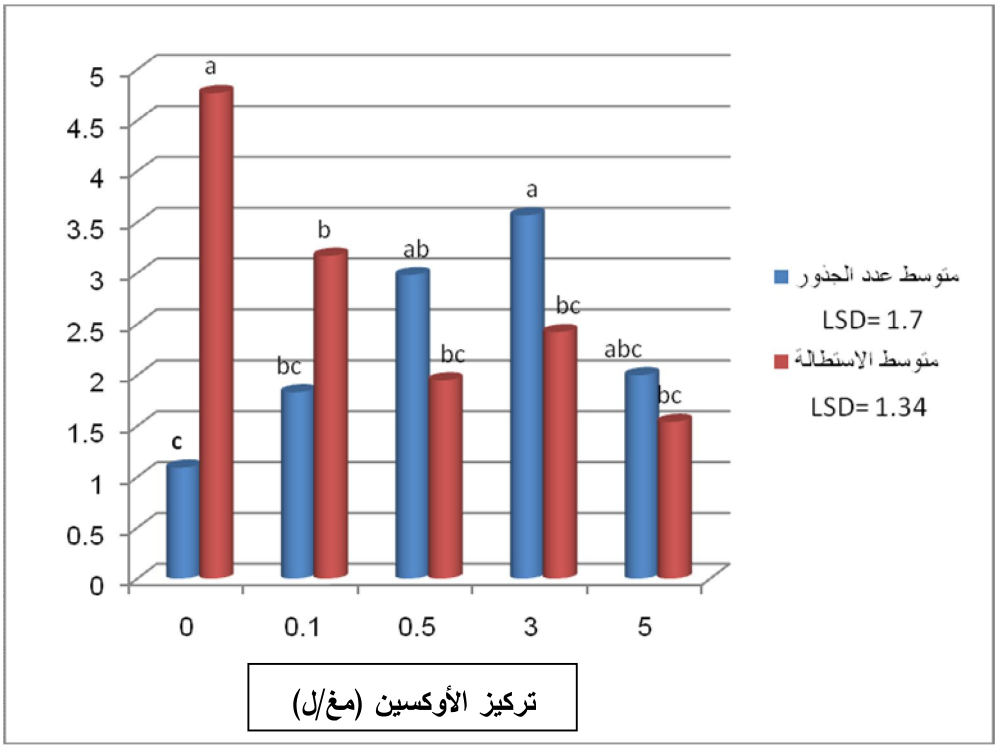
كما يلاحظ تفوق السوسن الأسود معنويا على السوسن الذهبي في طول الجذور الذي بلغ (٣.١٨ و ٢.٤٥ سم على التوالي) وذلك حسب المتوسط العام.

وعند دراسة تأثير التفاعل بين العوامل المدروسة، نجد بأن أكبر طول للنموات المتشكلة (٤.٧٩ سم) تم الحصول عليه في السوسن الأسود عند الزراعة في وسط الشاهد، بينما تم الحصول على أقل طول للجذور المتشكلة (٠.٤٢ سم) في السوسن الذهبي عند الزراعة في وسط يحوي ٠.٥مغ/ل IBA.

الجدول (13): دراسة تأثير تراكيز مختلفة من اوكسين IBA في متوسط طول الجذور في السوسن البري

النوع النباتي/ تركيز IBA (مغ/ل)	السوسن الأسود	السوسن الذهبي	متوسط طول الجذور
٠	٤.٧٩	٤.٧٥	**4.77** [a]
٠.١	٢.٧٥	٣.٥٨	**3.17** [b]
٠.٢	٣.٨٤	٢.١٧	**3.01** [b]
٠.٥	٣.٤٨	٠.٤٢	**1.95** [bc]
١	2.2	3.5	**2.85** [bc]
٣	٣.١٢	١.٧٣	**2.42** [bc]
٥	2.1	٠.٩٨	**1.54** [c]
تأثير الأنواع	**3.18** [a]	**2.45** [b]	***2.81***
LSD ١ %	تأثير الأنواع		٠.٧٢
	تأثير التركيز		١.٣٤
	تأثير الأنواع × التركيز		١.٨٩

- أخذت النتائج بعد ٣٠ يوم من الزراعة على وسط التجذير، والنتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين (تحليل Univariate باستخدام برنامج SPSS على مستوى ثقة ١%). تشير الأحرف المتشابهة إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.



الشكل (١٧): تاثير تراكيز مختلفة من اوكسين IBA في متوسط عدد الجذور ومتوسط الاستطالة.

تبين النتائج في الشكل (١٧) ازدياد متوسط عدد الجذور بزيادة تركيز الأوكسين في الوسط المغذي حتى التركيز ٣ مغ/ل الذي حقق أعلى قيمة، ثم نلاحظ انخفاضه بزيادة تركيز الأوكسين، حيث أن التراكيز العالية من الأوكسين تعيق نمو الجذور. كما يتضح أيضا بأن الشاهد الخالي من الهرمون أعطى أكبر استطالة جذرية بالمقارنة مع استخدام الأوكسين في الوسط . كما يلاحظ أن زيادة تركيز الأوكسين تقلل من طول الجذور المتكونة حيث أن زيادة تركيز الأوكسين تلعب دوراً سلبياً في استطالة الجذور(المعري، ١٩٩٥).

تعد هرمونات النمو النباتية منتجات طبيعية ذات وزن جزيئي منخفض تؤثر بتراكيز ضئيلة جدا لتنظيم كل العمليات الفيزيولوجية في النبات (Bajguz and Piotrowska, 2009)، حيث عرفت الأوكسينات بتأثيرها على العديد من العمليات في النبات ومن ضمن ذلك استطالة الخلايا، وتشكل الجذور العرضية (Srivastava, 2002; Gaba, 2005)، وعندما يتم إضافة الأوكسينات بتراكيز عالية يتم تشكل كالس أو أجنة جسمية نتيجة تنشيط عملية الإنقسام الخلوي، بالإضافة إلى أنه يصبح سام، و يحفز على إنتاج الإتيلين الذي قد يتسبب في إعاقة النمو، والحد من نمو الجذور (George, 1993; Gaba, 2005).

إن عدم تكون الجذور قد يعود إلى انخفاض نسبة الأوكسينات الداخلية في الأجزاء النباتية المزروعة التي لم تصل إلى درجة تحفيز الأجزاء في تكوين الجذور.

فيزيولوجياً هناك أربع مراحل للتجذير وهي: الدفع الجذري وفيها تتحـدد قابليـة الأفـرع لتكوين جذور جديدة، مرحلة خروج بداءات الجذور، ثـم تبـدأ التغيـرات التشـريحية، وأخيـراً الاستطالة الجذرية (Moncousin, 1986). إن الأوكسين قد يحفز أحد هذه المراحل ولكـن لـيس بالضرورة أن يكون محفزاً لجميعها، ولكن وجود الأوكسين ضـروري وأساسـي للـدفع الجـذري (Haissing, 1986) والاستطالة الخلوية (Rossignol *et al*., 1990)، ويعتمـد نجـاح أو فشـل تجذير العينات النباتية على الحالة الفيزيولوجية والتركيب الوراثي للمادة النباتية من جهـة، وعلـى تركيب الوسط وظروف الزراعة خلال معاملة التجذير من جهة أخرى (Druart *et al*, 1982).

٤-١-٣-٢ تأثير نوع المحلول المعدني في تجذير السوسن الأسود.

يبين الجدول (14) أن الزراعة في المحلول المعدني MS بكافة تراكيـزه (كامـل، 1/2، 1/3) تفوق معنويا على وسط Heller في النسبة المئوية للتجذير وقد أعطى المحلول المعدني MS بثلث تركيزه أعلى نسبة مئوية للتجذير (٩٥%)، وبفروق معنوية بالمقارنة مع وسط Heller بثلـث تركيزه الذي أعطى أقل نسبة مئوية للتجذير (٤٧.٥). يعود ذلك إلى تباين وجود بعـض العناصـر المغذية في كلا الوسطين. كما يلاحظ من الجدول أن زيادة تركيز المحلول المعدني MS أدى إلـى نقص تدريجي في نسبة التجذير، إذ أن كثيرا ما يعيق استخدام التراكيز العالية للأملاح المعدنية مـن ظهور وتشكل الجذور. عموما يتم اختيار الأوساط المعدنية ذات التراكيز المنخفضة مثـل: 1/2MS و1/4MS في التجذير ويفسر ذلك بالحاجة إلى مستويات منخفضة من النتروجين في طور التجـذير (George *et al*., 2008). وهـذا يخـالف مـا تـم التوصل إليه من قبـل Yabuya وزملائـه عام ١٩٩١ من أن النسبة المئوية للتجذير كانت أفضل عند الزراعة في وسط MS كامل.

الجدول (14): تأثير التركيب المعدني لوسط الزراعة في النسبة المئوية للتجذير ومتوسط عدد وطول الجذور المتكونة في السوسن الأسود.

نوع المحلول المعدني	MS	1/2MS	1/3MS	Heller	1/2Heller	1/3Heller	LSD 1%
النسبة المئوية للتجذير	٨٥ a	٨٧.٥ a	٩٥ a	٥٠ b	٥٢.٥ b	٤٧.٥ b	٢٤.٤
عدد الجذور	١.٤٧ b	٢.٥٢ a	٢.٤٥ a	٠.٧٧ b	١ b	١.١٥ b	٠.٨١
استطالة الجذور	٣.٧٢ a	٣.٥٩ a	٣.٧ a	١.٦٣ b	١.٥٨ b	١.٢٣ b	١.٠٥

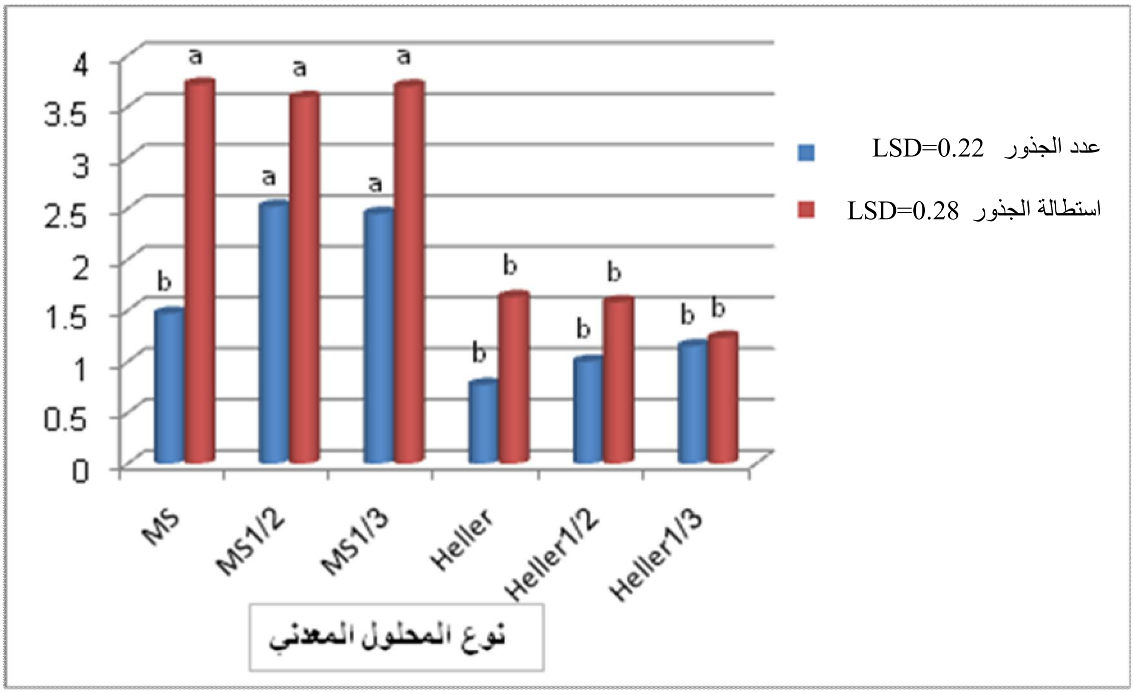
- أخذت النتائج بعد ٣٠ يوم من الزراعة على وسط التجذير، والنتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين (تحليل multiivariate باستخدام برنامج SPSS على مستوى ثقة ١%). الأحرف المتشابهة في السطر الواحد تشير إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

كمـــا بينت النتائج أن وسط MS بنصف تركيزه أعطى أعلـــى معــــــدل تجــذير بالنســبة لنبـــات الكركـــــم (Meenakshi *et al.*, 2001; Dipti *et al.*, 2005) ونبــــات الغلاديـــــول (Aftab *et al.*, 2008).

يلاحظ أيضاً من الجدول (14) و الشكل (١٨) تفوق الوســـط MS بكافــة تراكيــزه (٢/١ و٣/١ وكامل) على كافة التراكيز المستخدمة من وسط Heller في متوسط عدد الجذور الذي بلـــغ ٢.٥٢ جذر عند استخدام التركيز MS 1/2 مقابل ٠.٧٧ في وسط Heller كامل الشكل (١٩).

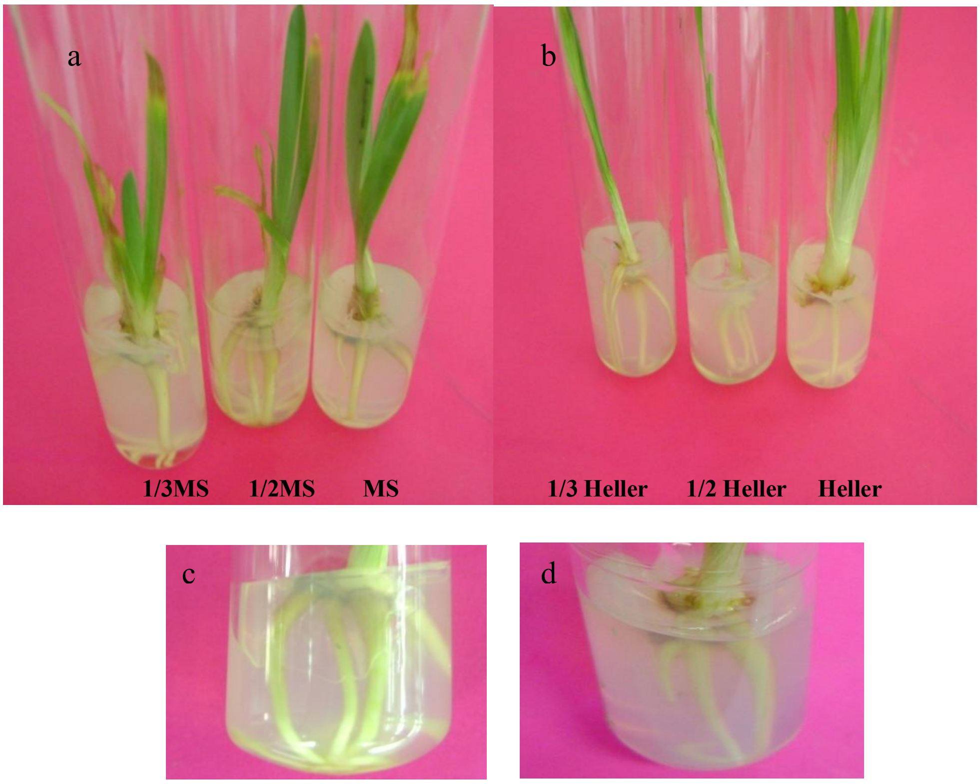
وجد Yabuya وزملائه عام ١٩٩١ أن وسط MS ½ أعطى أفضل متوسط لعــدد الجذور وهذا يوافق ماتم التوصل إليه في نتائجنا.

أما بالنسبة لمتوسط أطوال الجذور المتشكلة، فقــد تفــوق الوســـط MS بكافـــة التراكيــز المستخدمة (كامل و1/2 و1/3) معنوياً على كافة التراكيز المستخدمة مــن وســـط Heller حيـــث وصلت أعلى قيمة لمتوسط طول الجذور إلى (٣.٧٢ سم) عند استخدام وســـط MS كامـــل مقابـــل (١.٢٣ سم) في ١/٣ Heller وربما يعود ذلك لقلة عدد الجذور المتشكلة في وسط MS كامل.



الشكل (١٨) تأثير نوع المحلول المعدني في تجذير السوسن الأسود.

تبين النتائج الموضحة في الشكل (١٨) تفوق الوسط 1/2MS معنويا على وسط MS كامل في متوسط عدد الجذور، أما بالنسبة لوسط Heller لم يلاحظ وجود فروق معنويـــة بـــين مختلـــف التراكيز المستخدمة في متوسط عدد وطول الجذور.



الشكل (١٩) : عدد وطول الجذور المتشكلة في السوسن الأسود

a و b : عند استخدام أوساط MS و Heller بثلاث تراكيز مختلفة لكل منهما (كامل، 1/2، 1/3)

c: عند استخدام الوسط MS، d : عند استخدام الوسط Heller

٤-١-٤ مرحلة التقسية:

تم نقل النباتات في هذه المرحلة والتي حققت نمواً مقبولاً من مرحلة التجذير إلى أصص صغيرة وتم تقسيتها بشكل تدريجي. حيث تمت المحافظة على رطوبة نسبية عالية لضمان نجاح عملية التقسية مع استخدام المبيد الفطري في مياه الري للسيطرة على بعض الفطريات التي ظهرت خلال عملية التقسية، حيث لوحظ أن الري أكثر من مرة كل ٧-١٠ أيام ودون استخدام المبيد الفطري يؤدي لانتشار الفطريات بشكل كبير على سطح التورب وبالتالي فشل التقسية، لذلك تمت معاملة النباتات مرة كل أسبوعين بالمبيد الفطري وسقايتها مرة اسبوعياً بمحلول MS ¼ خلال الفترة التي تواجدت فيها النباتات ضمن غرفة النمو. وبعد نجاح التقسية تابعت النباتات نموها في البيت البلاستيكي، كما هو موضح في الشكل (٢١) حيث وضعت في البداية في مكان ظليل ثم نقلت بعد أسبوعين إلى مكان دون تظليل. اختلفت نسبة نجاح عملية التقسية باختلاف الأنواع النباتية، حيث بلغت نسبة النجاح ٨٦.٩٥% في السوسن الذهبي في حين بلغت ١٠٠% بالنسبة للسوسن الأسود، كما بلغ متوسط استطالة النموات ٢٣.٢٥ سم و24.53 لكل من السوسن الذهبي والأسود على التوالي وذلك بعد ٢ أشهر من عملية التقسية وبلغ متوسط استطالة الجذور (٣٧، ٣٠ سم) لكل

من السوسن الذهبي والأسود على التوالي (يوضح الشكل ٢٠ مراحل عملية التقسية، كما يوضح الشكلين ٢٢ و٢٣ استطالة المجموع الجذري والخضري بعد٢.٥ شهر وبعد ستة أشهر من عملية التقسية).

في حين بلغت نسبة نجاح عملية التقسية ٨٠% في نبات الغلاديول (Aftab *et al.*,2008). كما بينت النتائج أن نسبة نجاح عملية التقسية و النمو في نبات الزنجبيل أفضل في وسط البيتموس ثم الفيرميكيوليت ثم الرمل، يعود ذلك إلى الشروط النموذجية التي يؤمنها وسط التورب كالتهوية الجيدة، الاحتفاظ بالماء، ووجود العناصر المغذية الأمر الذي حسن نمو نباتات الزنجبيل (Hiremath, 2006).

تبقى مسامات النباتات المكاثرة بالأنسجة مفتوحة لذلك لا تستجيب للظروف الخارجية بالإنغلاق ما يؤدي لفقد محتواها من الماء بسرعة وذبول الأوراق (Brainerd and Fuchigami, 1982). وفي عام ١٩٨٥ أشار Broome و Zimmerman إلى ضرورة التدرج خلال عملية التقسية، حيث يتم نزع النموات المجذرة بلطف، وضمن شروط قياسية، ثم تنقل النباتات إلى تربة نفوذة وتحضن في مكان رطب عند ٩٠% رطوبة نسبية وحرارة ٢١ –٢٦ ^{o}م و بعد ١–٢ أسبوع تنقل النباتات إلى البيوت الزجاجية.

٤–١–٤–١ تأثير تركيز الأوكسين IBA المستخدم خلال مرحلة التجذير في متوسط استطالة النبيتات المقساة:

يلاحظ من الجدول (15) عدم وجود فروق معنوية بين التراكيز المختلفة من الأوكسين IBA في متوسط استطالة الأفرع النامية بعد ٢ شهر من عملية التقسية، كما لم يلاحظ أي فروق معنوية بين السوسن الأسود والذهبي من جهة أخرى (٢٢.٥ و٢١.٤٣ سم على التوالي)، وسجلت أكبر استطالة (٢٤.٥٣ سم) للأفرع من النبيتات التابعة للسوسن الأسود و المزروعة خلال مرحلة التجذير في وسط يحوي ٣ مغ/ل IBA، بينما سجلت أقل استطالة (١٩.٧٩ سم) للأفرع من النبيتات التابعة للسوسن الذهبي والمزروعة خلال مرحلة التجذير في وسط يحوي ٠.٥ مغ/ل.

ولكن تبين النتائج ارتفاع نسبة العينات الميتة من النباتات المقساة والتابعة للسوسن الذهبي إلى ٢٧% و ١٦.٦٧% عند استخدام كلا من التركيزين (٠.١، ١مغ/ل IBAعلى التوالي).

إذ تتأثر نسبة نجاح عملية الأقلمة بتغير نوع وتركيز الأوكسين كما في نبات *Watsonia* التابع للفصيلة السوسنية (Ascough *et al.*,2007).

الجدول (15): تأثير تركيز الأوكسين IBA أثناء طور التجذير في متوسط استطالة النباتات المقساة من السوسن البري

النوع النباتي/ تركيز IBA (مغ/ل)	السوسن الأسود	السوسن الذهبي	متوسط الاستطالة
٠	22.8	21.75	**22.28** [a]
٠.١	21.9	20.03	**20.96** [a]
٠.٢	23	22	**22.5** [a]
٠.٥	20	19.79	**20.24** [a]
١	22.1	21.74	**21.92** [a]
٣	24.53	23.25	**23.88** [a]
تأثير الأنواع	**22.5** [a]	**21.43** [a]	***21.96***
LSD ١ %	تأثير الأنواع		3.36
	تأثير التركيز		5.812
	تأثير الأنواع × التركيز		5.813

- **أخذت النتائج بعد ٢ شهر من النقل إلى الأصص، كررت التجربة ثلاث مرات بمعدل ٢٠ نبات لكل مكـرر والنتائج الموضحة في الجدول هي متوسط لثلاث تجارب (تحليـل Univariate باسـتخدام برنـامج SPSS على مستوى ثقة ١%).**
- **الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.**

٤-١-٤-٢ تأثير التركيب المعدني للأوساط المستخدمة خلال مرحلة التجذير في تقسية السوسن الأسود:

تم في هذه التجربة دراسة تأثير نوعية وتركيز المحاليل المعدنية المطبقـة خـلال مرحلـة التجذير في نوعية النباتات الناتجة عن التقسية، حيث تمت تقسية النباتات المزروعـة فـي مرحلـة التجذير في أوساط MS وHeller بثلاث تراكيز مختلفة لكل منها (كامل،1/2،1/3) والمضاف لهـا ٣ مغ/ل IBA ونقلت إلى أصص صغيرة تحوي تورب معقم.

يلاحظ من الجدول (16) عدم تأثر نسبة نجاح عملية التقسية (١٠٠%) بتغير نوع وتركيـز المحلول المعدني المستخدم، كما تبين وجود فروق معنوية بين نـوعي الأوسـاط المسـتخدمة فـي متوسط استطالة الأفرع النامية بعد مضي شهرين من عملية التقسية، حيث سجلت أكبـر اسـتطالة

(٢٣.١٧ سم) للأفرع من النبيتات التي زرعت خلال مرحلة التجذير في وسط 1/2MS من دون وجود فروق معنوية بينه وبين باقي التراكيز التابعة لنفس الوسط (MS)، بينما سجلت أقل استطالة (١٣.٢٥ سم) للأفرع من النبيتات التي زرعت خلال مرحلة التجذير في وسط Heller كامل.

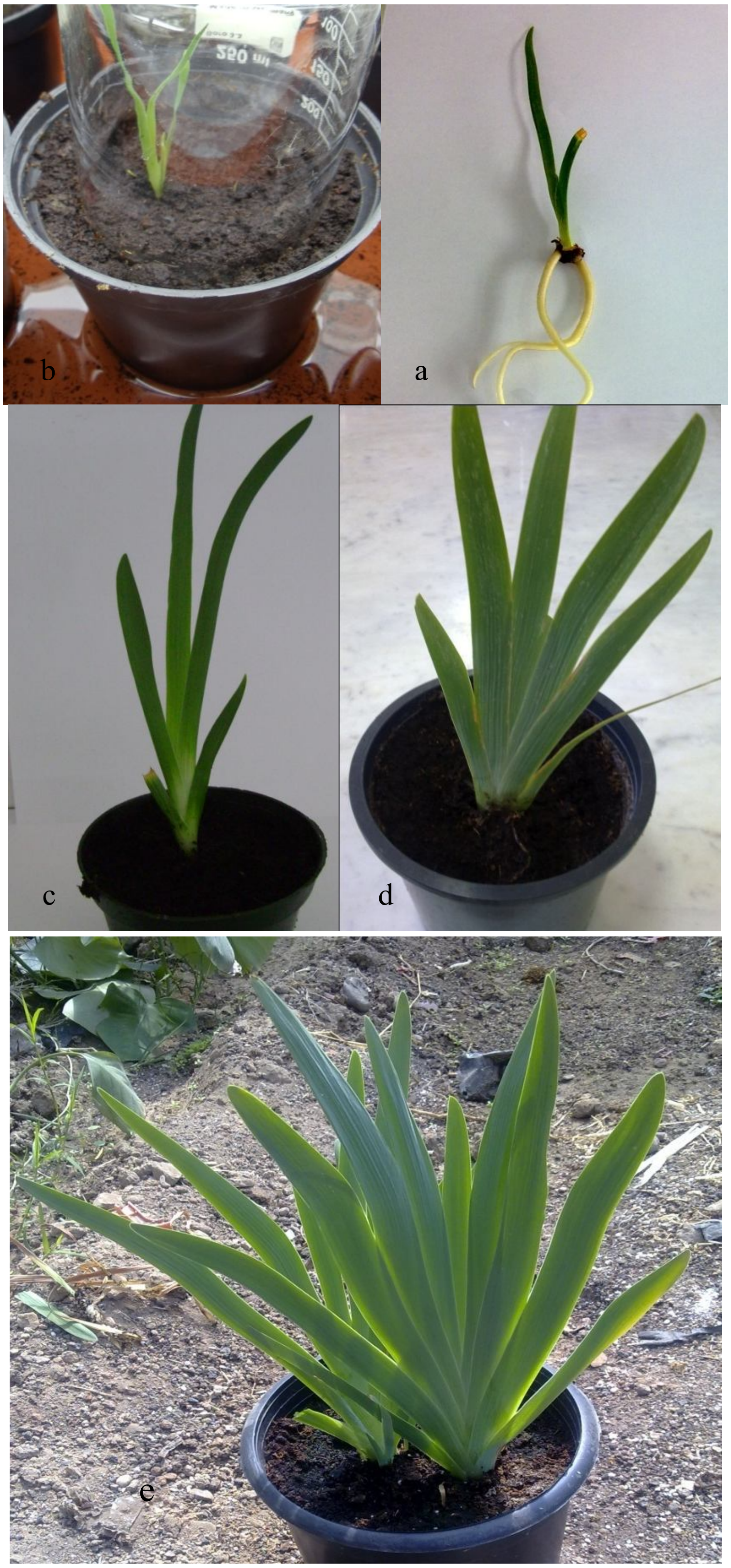
الجدول (16) اختلافات نسبة نجاح عملية التقسية ومتوسط استطالة النباتات بتغير نوع وتركيز المحلول المعدني المطبق خلال مرحلة التجذير في السوسن الأسود:

نوع المحلول المعدني	MS	1/2MS	1/3MS	Heller	1/2Heller	1/3Heller	LSD 1%
نجاح عملية التقسية %	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠	٠
متوسط استطالة النباتات	٢٣.٠٦ a	٢٣.١٧ a	٢٢.١ a	١٣.٢٥ b	١٦.٥٨ b	١٤.٦٥ b	٦.٢٨

- أخذت النتائج بعد شهرين من النقل إلى الأصص، كررت التجربة ثلاث مرات بمعدل ٢٠ نبات لكل مكرر والنتائج الموضحة في الجدول هي متوسط لثلاث تجارب.

- الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.

أدى تقليم أو إزالة الجذور النامية مخبريا لنباتات العنب إلى تكوين جذور عرضية أفضل بالمقارنة مع نباتات الشاهد، كما تأثر النمو بعد ٤ أسابيع من الزراعة بشكل خفيف بمعاملة تقليم الجذور وبشكل كبير بمعاملة إزالة الجذور. خفضت هذه المعاملات من تأثير عدد الجذور المتشكلة داخل الأنابيب في قوة نمو النباتات المنقولة للخارج (Thomas and Ravindra, 1997).



الشكل (٢٠) : مراحل عملية التقسية

a: النباتات المنقولة لمرحلة التقسية، b: تغطية النباتات بالأوعية الزجاجية المعقمة

c : بعد ٣٠ يوم من التقسية، d : بعد ٨٠ يوم من عملية التقسية، e: بعد ٥ أشهر من عملية التقسية



الشكل (٢١): زراعة النباتات في البيت البلاستيكي



الشكل (٢٢): استطالة المجموع الجذري و الخضري للسوسن الذهبي بعد ٢.٥ شهر من عملية التقسية



الشكل (٢٣) : استطالة المجموع الجذري والخضري للسوسن الأسود بعد ستة أشهر من عملية التقسية

تبين النتائج في الشكل (٢٣) متوسط استطالة المجموعة الخضرية (٥١ سم تقريبا) ومتوسط طول الجذور الدرنية (١٦.٥ سم تقريبا) بعد ستة أشهر من عملية النقل، كما لــوحظ بدايــة تشــكل الريزومات والبراعم الجانبية على النباتات.

٤-٢ التحليل الكروماتوغرافي باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا الغازية GC-MS.

تبين نتائج عملية تقطير السوسن البري نسبة الزيت المستخلص والتي كانت٠١٣ %، ٠.٠٢٤ % ٠.٠١٢ % (w/w) لكل من السوسن الأسود والذهبي والألماني على التوالي.

أجري التحليل الكروماتوغرافي للتعرف على أهم المركبات الموجودة في زيوت ريزومات الأنواع الثلاثة المدروسة باستخدام جهاز GC-MS. كما لا بد من الإشارة إلى أهمية قياس المواد الفعالة الأخرى باستخدام تقنية HPLC مثل Iridin وIrigenin وIridal التي لم نتمكن من قياسها بسبب عدم توفر الستاندرات اللازمة لذلك في السوق.

تم تحديد ٢٣ مركب موجودة في السوسن الألماني و١٨ في السوسن الأسود و١٩ في السوسن الذهبي، كما بينت النتائج الموضحة في الجدول (17) والأشكال (٢٤) و(٢٥) و(٢٦) أن أكبر مركب تواجد في الزيت الأساسي هو حامض الميرستيك Tetradecanoic acid وكانت نسبته (٦١.٤٢ و٨٠.٣٣ و٧٠.٦٧ % من الزيت) في كل من السوسن الألماني والأسود والذهبي على التوالي، يليه بعد ذلك عدة مركبات مثل

Dodecanoic acid و Decanoic acid و Hexadecanoic acid,methyl ester و 9-Octadecenoic acid, methyl ester .

يعد حامض الميرستيك المركب الرئيسي الموجود في زيت جوزة الطيب حوالي (٧٦.٦ %) (زويل، ١٩٦٤). الزيوت والدهون مواد ذوابة في المذيبات العضوية لكنها غير ذوابة في الماء، يمكن أن تكون سائلة أو صلبة في درجة الحرارة العادية . كيميائيا الدهون عبارة عن غليسريدات ثلاثية الاسترات (Anthea,1993). تشكل الأحماض الدهنية ٩٥% من وزن الدهون والزيوت ولذلك فإن كلا من الخصائص الكيميائية والفيزيائية للدهون تتأثر بنوع وخصائص الأحماض الدهنية المكونة لها (Johnson and Saikia,2009). تتكون الأحماض الدهنية من مركبات أليفاتية أحادية الكربوكسيل وتحتوي جميع الأحماض الدهنية (الموجودة في الطبيعة) على عدد زوجي من ذرات الفحم وهي تختلف عن بعضها البعض في عدد ذرات الفحم في السلسلة الكربونية وفي عدد ومواقع الروابط المزدوجة بينها (عودة، ١٩٧١)، يمكن ان تكون الأحماض الدهنية مشبعة وهو الحمض الذي أشبعت جميع ذرات الفحم المكونة له، أو غير مشبعة (Johnson and Saikia,2009).

تعتبر الدهون من المركبات الهامة المستخدمة في الحميات الغذائية، كونها مذيبة لبعض الفيتامينات (مثل فيتامين A) ومضادات الأكسدة إذ لا يمكن للجسم امتصاص هذه المواد ما لم تتواجد الدهون بالحميات الغذائية، بالإضافة لذلك تعتبر مصدرا جيدا للطاقة (Johnson and Saikia,2009).

للأحماض الدهنية خصائص مضادة للبكتيريا والفطريات (Kabara *et al* ., 1972; Hayes and Berkovitz,1979; Agoramoorthy *et al*.,2007)، كما تبين أن: (Lauric, palmitic, Linolenic, Linoleic, oleic, stearic and myristic acid) تعد مواد مضادة للبكتيريا والفطريات (McGaw *et al*.,2002; Seidel and Taylor,2004)، بالإضافة إلى أنها تعتبر انتقائية ضد الكائنات الحية موجبة الغرام (Kabara *et al*., 1972) عن طريق استهدافها لبنية ووظيفة الجدار الخلوي، والأغشية الخلوية. كما لها تأثيرات مسكنة ومنومة (Zhang *et al*., 1995).

الجدول (17): المركبات الكيميائية الموجودة ونسبة كل منها في الزيت الأساسي لكل من السوسن الألماني (iris 1) والأسود (iris 2) والذهبي (iris 3)

N	RT	Compounds	Iris1	quality	Iris 2	quality	Iris 3	quality
1	8.82	α – Limonene					0.05	99
2	17.18	Caprylic acid or Octanoic acid			0.04	58	0.08	74
3	27.86	Capric acid or Decanoic acid	0.14	٩٧	2.52	98	4.02	98
4	29.1	Capric acid, ethyl ester or Decanoic acid ethyl ester			0.11	98		
5	29.21	Tetradecane	0.08	٩٨	0.04	95	0.12	98
6	35.24	Benzoic acid,4-ethoxy-,ethyl ester	0.12	٩٣	-			
7	35.68	α – Iron	0.25	٩٧	0.07	98		
8	38.02	Dodecanoic acid or Lauric acid	5.69	٩٨	4.83	99	6.97	99
9	38.92	Hexadecane	0.11	٩٥	0.13	93	0.11	96

10	41.67	**Jatamansone,(+)-**					**0.04**	**98**
11	44.53	**Tetradecanoic acid, methyl ester**			**0.19**	**99**	**0.09**	**96**
12	47.09	**Tetradecanoic acid or Myristic acid**	**61.42**	**٩٩**	**80.33**	**99**	**70.67**	**99**
13	50.64	**Tetradecanoic acid, 2-oxo-, ethyl ester**			**0.18**	**38**	**0.67**	**46**
14	50.74	**3-Methyl-1,2-Benzoiso selenazple**	**0.61**	**٨٦**	**-**			
15	50.82	**Hexadecanoic acid,methyl ester or Palmitic acid, methyl ester**	**5.1**	**٩٨**	**1.33**	**97**	**1.42**	**97**
16	51.99	**Hexadecanoic acid or Palmitic acid**	**4.87**	**٩٦**	**2.13**	**99**	**2.41**	**99**
17	52.58	**Octadecanoic acid or stearic acid**	**-**		**0.12**	**93**		
18	52.66	**Methyl 10-methyl-hexadecanoate**					**0.34**	**83**
19	52.78	**9-Octadecenoic acid (Z)- or Oleic acid**	**0.53**	**٦٠**				
20	53.32	**Heptadecanoic acid, methyl ester**			**0.14**	**95**	**0.37**	**98**
21	54.03	**9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester or Linoleic acid methyl ester**	**1.19**	**٩٩**	**0.25**	**99**	**0.36**	**99**
22	54.24	**9-Octadecenoic acid, methyl ester,(E)- or Elaidic acid methyl ester**	**6.61**	**٩٧**	**2.38**	**99**	**4.55**	**99**
23	54.83	**10- Octadecenoic acid, methyl ester**	**0.7**	**٩٧**	**-**			
24	54.9	**Heneicosane**			**0.69**	**98**	**1.02**	**62**
25	55.4	**Octadecanoic acid, methyl ester or stearic acid, methyl ester**	**5.4**	**٩٧**	**1.48**	**89**	**2.07**	**95**

26	55.5	**Heneicosanoic acid**					**0.03**	**62**
27	55.64	**9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- or Linoleic acid**	**1.1**	**٩٩**				
28	56.11	**2-Propenoic acid, 3-(4-methoxyphenyl)-, 2-ethylhexyl ester**	**0.16**	**٩٢**	**0.05**	**99**	**0.19**	**95**
29	56.80	**Decane**	**0.0501**	**٥٥**				
30	58.32	**Thiosulfuric acid (H2S2O3), S - (2-aminoethyl) ester**	**0.1**	**٩١**	**0.08**	**95**		
31	58.63	**Nonadecane**	**0.55**	**٩٧**	**0.66**	**97**	**1.08**	**97**
32	60.2	**12-Methyltricosane**					**0.08**	**83**
33	60.35	**Sulfurous acid, 2-propyl tetradecyl ester**	**0.28**	**٩٠**	**0.06**	**87**		
34	61.98	**Docosane**	**1.08**	**٩٨**	**0.08**	**92**	**0.13**	**98**
35	٦٢.٢	**Eicosane**	**-**		**0.44**	**97**	**0.88**	**97**
36	62.75	**1.2-Benzenedicarboxylic acid, dioctyl ester**	**0.15**	**٦٤**			**0.15**	**91**
37	62.8	**Di-(2-ethylhexyl)phthalate $$ 1,2-Benzenedicarboxylic acid**					**0.11**	**78**

تم التعرف على إحدى عشر مركب من مستخلص البتروليوم ايتر للسوسن الألماني وكـــان أهمها: 9 ,8 ,١١ ,١٠ ,١٣, ١٦- Octadecenoic acid , methyl ester و 9-Hexadecanoic acid و 1.2-Benzenedicarboxylic acid, dioctyl ester وقد تبـــين أن المستخلص فعال ضد الميكروبات و له نشاط أكسدة قوي (Asghar *et al.*, 2011).

تبين النتائج في الجـــدول (18) أن نســـبة حـــامض الميرســـتيك Tetradecanoic acid الموجودة في السوسن الأسود (80.33%) كانت الأعلى وبفروق معنوية مع النسبة الموجـــودة فـــي السوسن الألماني (٦١.٤٢ %)، كما توضح النتائج عدم وجود فروق معنوية بين السوسن الـــذهبي من جهة و كل من السوسن الأسود و الألماني في محتواه من حامض الميرستيك من جهة أخرى.

وهذا يوافق ما تم التوصل إليه من قبل Deng وآخرون عام ٢٠٠٨ من أن حامض الميرستيك هو المركب الرئيسي في زيت الريزومات الحديثة والمعمرة للنوع *Iris pallida* (٣١.٧٧ و٢٨.٠٢ %على التوالي)، كما تبين النتائج أن لهذا المركب نشاط مضاد للفطور (Parang *et al*.,1996).

أما بالنسبة للمادة (9-Octadecenoic acid, methyl ester) وهي ثاني أكبر مركب موجود في زيت السوسن الألماني يلاحظ عدم وجود فروق معنوية لهذه النسبة بين السوسن الألماني والسوسن الذهبي (٦.٦١،٤.٥٥ % على التوالي)، علما أن لهذه المادة تأثيرات مضادة للعوامل المسرطنة (Yeong *et al*., 1989)، وللأمر أهمية كون هذه النسبة الموجودة في نوع مستوطن في سورية (السوسن الذهبي) مقاربة لما هي في السوسن الألماني في حين تنخفض هذه النسبة في السوسن الأسود إلى (٢.٣٨ %) مع وجود فروق معنوية بينها ومثيلتها في السوسن الألماني.

في حين أن المادة (Lauric acid) وهي ثالث أكبر مادة في السوسن الألماني (٥.٦٩ %) وثاني أكبر مادة موجودة في الزيت لكل من السوسن الأسود والذهبي (٤.٣٨، ٦.٩٧ % على التوالي) تبين النتائج عدم وجود فروق معنوية للنسب بين أنواع السوسن المذكورة . وتتجلى الأهمية في هذه الحالة كون أن لهذه المادة تأثيرات كثيرة نذكر منها:

فعاليتها ضد حب الشباب حيث وجد أن لها تأثير قاتل للبكتيريا المسببة لها عند التركيز ٨µg/ml (Yang *et al*.,2009)، تأثيره المضاد للبكتيريا (Rouse *et al*.,2005)، للفطور (Rihakova *et al*.,2001a)، للأورام السرطانية (Kato *et al*., 1971)، والمضاد للإلتهاب (Calder and Grimble,2002)، كما أن لها نشاط مضاد للميكروبات ذات الخلية الواحدة (Saravanakumar *et al*.,2008)، وللفيروسات (Villamor *et al*.,2007).

يبين المرجع (Deng *et al*, 2008) حول استخلاص الزيت من النوع الطبي *Iris pallida* المتميز بخواصه المضادة للبكتيريا والفطريات والمضادة للأكسدة أنه يحتوي على نسبة من حمض اللوريك (٦.٤١ %) مقاربة للنسبة التي حصلنا عليها في السوسن الذهبي (٦.٩٧%).

تبين النتائج في الجدول (18) أن (Octadecanoic acid, methyl ester) هي رابع أكبر مركب في السوسن الألماني (5.41%)، وبفروق معنوية مع كل من السوسن الأسود والذهبي (١.٤٨، ٢.٠٧ %على التوالي).

الجدول (18) المركبات الكيميائية المشتركة الموجودة في زيت كل من السوسن الألماني والأسود والذهبي

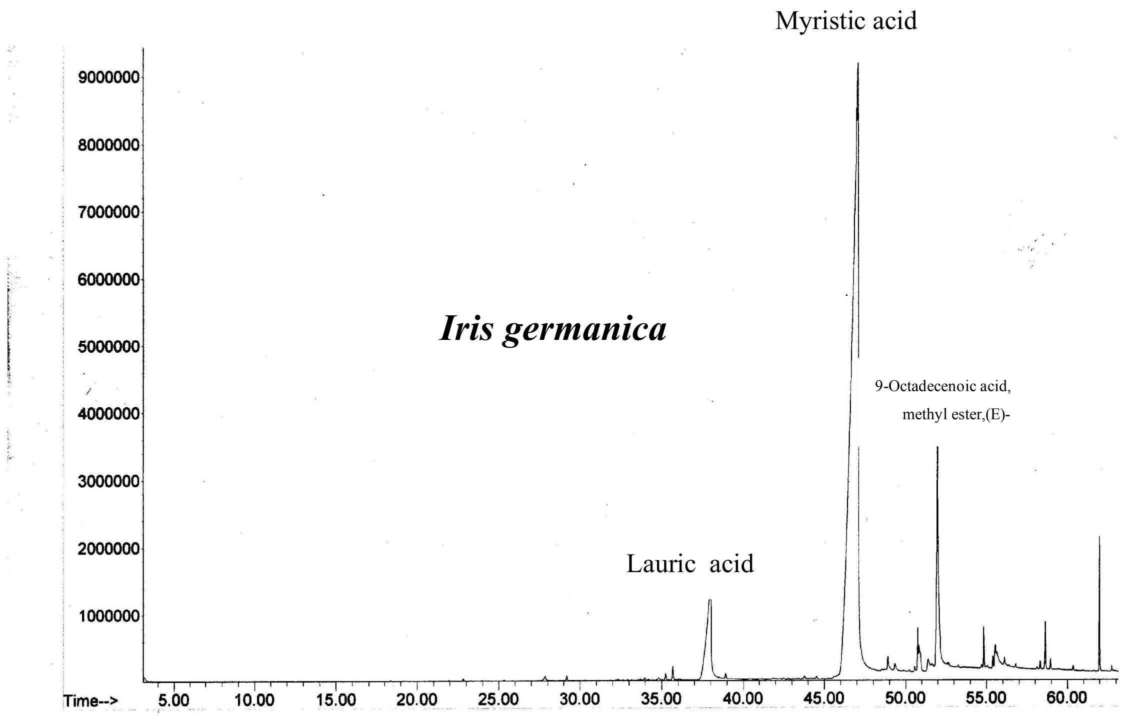
Compound المركب	*I.germanica*	*I.nigricans*	*I.aurantica*
Decanoic acid	0.00± 0.14 [c]	0.22±٢.٥٢ [b]	0.69±4.02 [a]
Tetradecane	0.00± 0.08 [b]	0.00±0.04 [c]	0.02±0.12 [a]
Lauric acid	2.26±5.69 [a]	0.17±٤.٨٣ [a]	1.80±6.97 [a]
Hexadecane	0.00±0.11 [a]	0.04±0.13 [a]	0.00±0.115 [a]
Tetradecanoic acid (Myristic acid)	14.19±61.42 [a]	7.88±80.33 [b]	3.01±70.67 [ab]
Hexadecanoic acid,methyl ester(Palmitic acid, methyl ester)	2.12±5.10 [a]	1.07±1.33 [b]	0.44±1.42 [b]
Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	0.04±4.87 [a]	1.14±2.13 [a]	1.04±2.41 [a]
9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester	0.00±1.19 [a]	0.19±0.25 [b]	0.16±0.36 [b]
9-Octadecenoic acid, methyl ester,(E)-	1.28±٦.٦١ [a]	0.36±2.38 [b]	1.9±4.55 [ab]
Octadecanoic acid, methyl ester	0.14±5.41 [a]	0.70±1.48 [b]	1.38±2.07 [b]
2-Propenoic acid, 3-(4-methoxyphenyl)-, 2-ethylhexyl ester	0.04±0.16 [a]	0.00±0.05 [a]	0.10±0.19 [a]
Nonadecane	0.01±٠.٥٥ [a]	0.43±0.66 [a]	0.00±1.08 [a]
Docosane	0.47±1.08 [a]	0.00±0.08 [b]	0.00±0.13 [b]

- أجريت جميع التجارب على ثلاث مكررات وسجلت النتائج كمتوسط ± الإنحراف المعياري.
- أجري التحليل الإحصائي باستخدام برنامج **Minitab 14** .
- الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات.
- أجري اختبار تحليل التباين **Anova** باستخدام تحلل **General Linear Model** بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة وتبعت باختبار **Tukey** لتحديد الفروق المعنوية بين المتوسطات على مستوى ثقة 95 % ($P\leq0.05$).

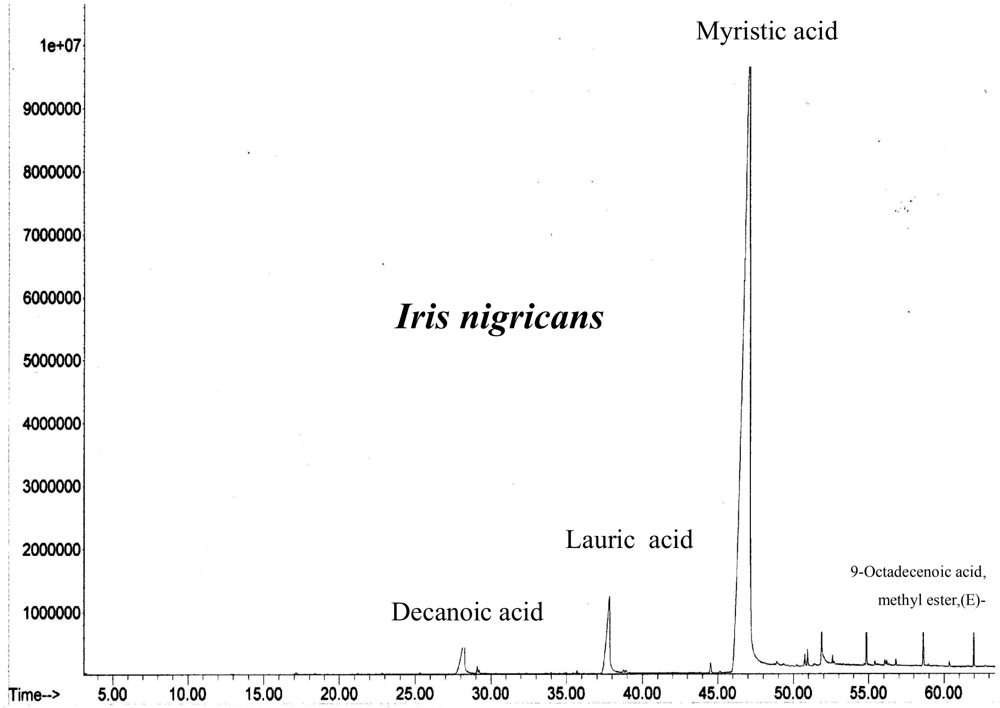
ومن المركبات الكبيرة الموجودة في السوسن الألمـــاني (Hexadecanoic acid, methyl ester) فكانت نسبتها (٥.١%)، إذ تبين وجود فروق معنوية بينها وبين كل من السوسن الأســـود والـــذهبي (١.٣٣، ١.٤٢ % على التوالي)، وتلعب هـــذه المـــادة دور طـــارد للحشـــرات (Henderson *et al.*,1991)، كما تمنع تطور يرقات بعض الحشرات (Mc Farlane,1968)، ولها خواص مضادة للعث والطفيليات (Wang *et al.*,2009). وكذلك المادة (Hexadecanoic acid) وجـــدت بنســـبة جيدة (٤.٨٧ %) وبدون فروق معنوية مع كل من النوعين المذكورين سابقا. وتبين الأبحاث أن لها نشاط مضاد للبكتيريا (Nalina and Rahim, 2007; Manilal *et al.*, 2009).

تبين لدينـــا مـــن الجـــدول أن المـــادة (Decanoic acid) عاليـــة النسبـــة في السوســـن الذهبـــي (4.02 %) مقارنـــة مـــع كـــل مـــن السوسن الألماني والأســـود وبفـــروق معنويـــة (على التوالي)، والتـــي تبين أن لها نشـــاط كبيـــر مضـــاد للبكتيريـــا (Petschow *et al.*,1996) والفطريات (Bergsson *et al.*, 2001) وكعامـــل محســـن للإمتصـــاص الفمـــوي للأنســـولين (Radwan and Aboul-Enein, 2002)، كما استخدمت اســـترات هـــذا المركـــب فـــي الطـــب والحميات الغذائية، وتلعب الغليسريدات الأحادية والثنائية للمركب دور كعوامل قادرة علـــى إذابـــة الكوليستيرول (Babayan , 1981).

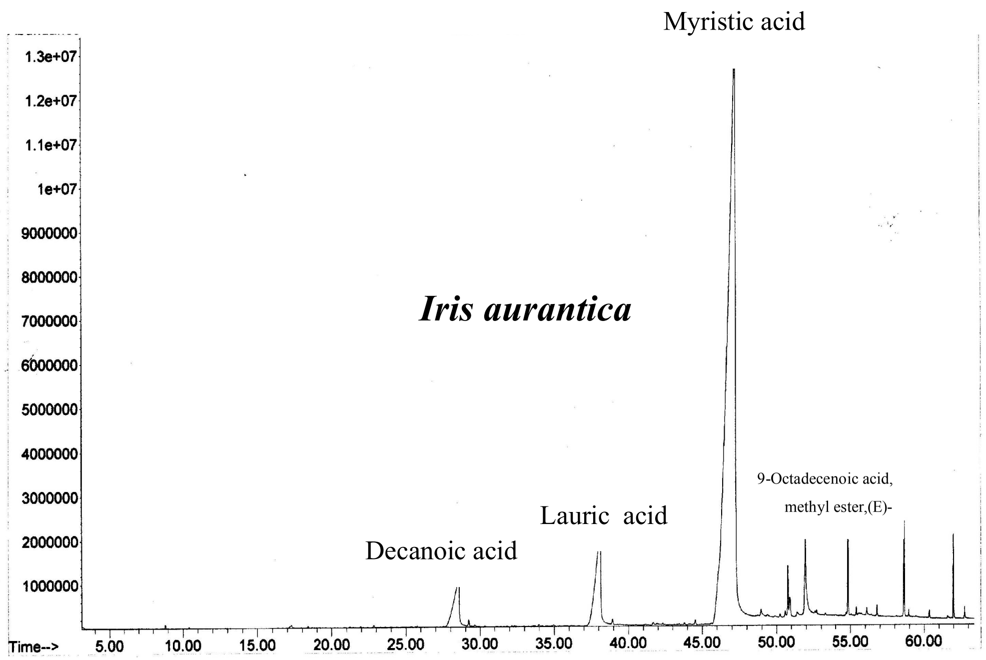
وهذا يوافق ما تم التوصل إليه من قبل Deng وزملائه عام ٢٠٠٨ مـــن أن Decanoic acid موجود في زيت النوع *Iris pallida* .



الشكل (٢٤) : مخطط تحليل جهاز GC-MS لعينات نبات السوسن الألماني



الشكل (٢٥) : مخطط تحليل جهاز GC-MS لعينات نبات السوسن الأسود



الشكل (٢٦) : مخطط تحليل جهاز GC–MS لعينات نبات السوسن الذهبي

٥-١الاستنتاجات:

تم في هذا البحث وضع تقنية للإكثار الخضري الدقيق لنبات السوسن الأسود و الذهبي وذلك لأول مرة في سورية بالنسبة للسوسن الأسود أما بالنسبة للسوسن الذهبي فقد تمت لأول مرة محليا وعربيا وعالميا عن طريق استخدام البراعم الريزومية وقواعد الأوراق بشكل مباشر دون المرور بمرحلة الكالس، كما تم تحديد أفضل الأجزاء النباتية المستخدمة استجابةً للزراعة التأسيسية، والتي تمثلت بالبراعم الريزومية.

- بينت النتائج أن أفضل وسط إكثار هو الوسط الذي يحوي 5 مغ/ل من BAP مع 0.1 مغ/ل من IBA حيث حقق أعلى معدل إكثار واستطالة في السوسن الأسود، بينما حقق استخدام التركيز ٣ مغ/ل IBA مع ٠.١ مغ/ل IBA أعلى معدل إكثار واستطالة في السوسن الذهبي.
- إن استخدام التركيز٣ مغ/ل من الأوكسين IBA مثالي للتجذير حيث أعطى أفضل نسبة تجذير (٨٩.٢٥ %) وأكبر عدد للجذور وباستطالة جيدة. وقد تمت عملية التقسية بنجاح بنسبة عالية (٨٦% – ١٠٠ %) حسب نوع السوسن البري.
- تم تحليل مكونات الزيت لأول مرة محليا بالنسبة للسوسن الاسود أما بالنسبة للسوسن الذهبي تمت لاول مرة محليا وعربيا وعالميا بواسطة جهاز GC-MS .

٥-٢ المقترحات:

- تطبيق تقنية زراعة الأنسجة النباتية لحفظ وإكثار أنواع السوسن البرية المهددة بالإنقراض في سورية بهدف وضع خطة مناسبة للحفاظ عليها، كمصادر وراثية لأغراض طبية وتزيينية وغيرها.
- إجراء تجارب حول استخدام الأجزاء الزهرية في عملية الإكثار الخضري الدقيق لنبات السوسن البري.
- تطوير تقنية تكوين الأجنة الخضرية الذي سيستفاد منها في إكثار الأنواع وحفظ الأصول الوراثية بالآزوت السائل.
- استكمال التحليل الكيميائي لبعض المكونات مثل Irigenin و Iridin لمعرفة نسبتها، كما لا بد من إجراء تجارب لإمكانية الاستفادة من هذه الأنواع في المجال الطبي والصيدلاني.

الفصل السادس: المراجع

REFRENCES

المراجع العربية

1- الأطرقجي، عمار عمر.(1996). دراسات في الإكثار الخضري الدقيق لنبات الليلاكي والشيخ الشجيري وفرشه البطل . رسالة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، العراق.

2- البطل، نبيل. (1986) . نباتات الزينة – المطبعة الجديدة، كلية الزراعة –جامعة دمشق، ٣١٠ صفحة.

٣-- البطل، نبيل. (2003). نباتات الزينة الخارجية، منشورات جامعة دمشق.

٤ – الحكيم، وسيم. (1996) . النباتات الطبية والعطرية – منشورات جامعة دمشق.

٥–القضاة، عبد المطلب . (٢٠٠٨). التكاثر الخضري الدقيق لصنفي المشمش البلدي و العجمي وأصل الخوخ رين كلود P3116 (تورنيل). رسالة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

٦– الكناني، فيصل رشيد .(1987). زراعة الأنسجة والخلايا النباتية، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، العراق .

٧–المعري، خليل. (١٩٩٥). إكثار النخيل بواسطة تقنيات زراعة الأنسجة النباتية، كلية الزراعة، جامعة الملك فيصل، السعودية.

٨– الموسى، رحاب .(٢٠١٠). دراسة بعض العوامل المؤثرة في الإكثار الدقيق لنبات ألستروميريا. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

٩– زويل، محمد البسيوني .(١٩٦٤). الزيوت والدهون . دار المعارف، الاسكندرية، مصر.

١٠– سيد محمد، عبد المطلب ومبشر صالح، عمر. (1990). المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والأنسجة والأعضاء للنبات. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل، العراق، 296 صفحة.

١١– عودة، كرم .(١٩٧١). كيمياء الأغذية وتحليلها، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

المراجع الأجنبية :

١-Aftab, F., Alam, M. and Afrasiab, H. (2008). *In vitro* shoot multiplication and callus induction in *Gladiolus hybridus*. Hort. Pak. J. Bot., 40(2): 517-522.

٢-Agoramoorthy, G., Chandrasekaran, M., Venkatesalu, V. and Hsu, M.J. (2007). Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the Blind –your-eye mangrove from India. Br. J. Microbio., 38: 739-742.

٣- Ali, S. I. and Mathew, B. (1993). Flora of Pakistan. In: Ali, S. I., Qaiser, M.
(Eds.), Department of Botany, University of Karachi, Pakistan, 202: 4-29.

4- Almaarri, K., Arnaud, E. T. E. and Miginiac, E. (1986). Micropropagation *in vitro* du poirier cv" Williams" par culture des meristemes. 26th- Science week, auditorium.The University of Teshrine, Latakia, Syria. 1-7 November.

٥-ALMaarri, K., Arnaud, Y. and Miginiac , E. (1994). Micropropagation of *Pyrus communis* Passe Crassan and Williams: factors affecting root formation *in vitro*. Scie. Hort., 58: 207-214.

6- ALMaarri, K. and Xie, D. Y. (2010). *In vitro* direct organogenesis and micropropagation of *Artemisia annua*. Damascus University Journal for the Agricultural Sciences, 26(2): 327-337.

7- Aloni, R. (2004). The induction of vascular tissues by auxin. pp.471-492 in Davies P.J.(ed.).Plant Hormones,Kluwer Academic Publishers,Dordrecht.

8-Anthea, M., Hopkins, J., McLaughlin, C. W., Johnson, S., Warner, M, Q., LaHart, D. and Wright, J. D. (1993). Human biology and health. Englew-ood Cliffs, New Jersey, USA.

9-Asao, T., Kawase, K. and Yoshioka, M. (1993). *In vitro* shoot formation from explant of perianth base and ovary in Siberian *Iris*. Plant Tissue Cult., 10: 188-190.

10- Ascough, G. D., Erwin, J. E. and Van Staden, J. (2007). *In vitro* propaga-tion of four *Watsonia* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 88: 135-145.

11- Ascough, G. D., Erwin, J. E. and Van Staden, J. (2008). *In vitro* storage organ formation on ornamental geophytes. Horticultural Reviews ,34: 417- 446.

12- Ascough, G. D., Erwin, J. E. and Van Staden, J. (2009a). Micropropagation of Iridaceae - a review. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 97: 1-19.
13- Ascough,G. D., Swart, P. A., Finnie, J. F. and Van Staden, J. (2011). Micropropagation of *Romulea minutiflora, Sisyrinchium laxum* and *Tritonia gladiolaris* - Iridaceae with ornamental potential . South African Journal of Botany, 77: 216-221.
14- Asghar, S. F., Rehman, H. U., Choudahry, M. I. and Rahman, A. U. (2011). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of petroleum ether extract (oil) and bio-assays of crude extract of *Iris germanica.* Int. J. Genet. Mol. Biol., 3(7): 95-100.
15- Auge , R., Beauchesne, G., Boccon-Gibod, J., Decourtye, L., Digat, B., Galandrin, C. I., Minier, R., Morand, C. I. and Vidalie, H. (1984). La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Technique et documentation .
16- Babayan, V. K. (1981). Medium chain fatty acid esters and their medical and nutritional applications. J. Am. Oil Chem. Soc., 58(1): 49-51.
17- Bajguz, A. and Piotrowska , A. (2009). Conjugates of auxin and cytokinin. Phytochemistry, 70(8): 957-969.
18- Balachandran, S. M., Bhat, S. R. and Chandel, K. P. S. (1990). *In vitro* clonal multiplication of Turmeric (*Curcuma sp*.) and Ginger (*Zingiber officinale* (Rosc.). Plant Cell Reports, 8: 521-524.
19- Bartram, T. (1995). Bartram`s encyclopedia of herbal medicine. 1^{st} edn., Grace Publishers, Bournemouth. London, Robinson.
20- Ben -Jaacov, J., Ackermana, A., Tal, E. and Jacobs, G. (1991).Vegetative propagation of *Alberta magna* by tissue culture and grafting. Hort. Sci., 26, 74.
21-Benoit -Vical, F., Imbert, C., Bonfils, J. P. and Sauvaire, Y. (2003). Antiplasmodial and antifungal activities of iridal, a plant Triterpenoid. Phytochemistry, 62: 747-751.
22- Bergsson, G., Arnfinnsson, J., SteingrImsson, O. and Thormar, H. (2001) *In vitro* killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. Antimicrob. Agents Chemother., 45(11): 3209-3212.
23- Block, R. and Lankes, C.(1996). Massnahmen gegen die verbräunung bei der *in vitro*-etablierung der apfelunterlage M9. Gartenbauwiss, 61: 7-11.
24- Boltenkov, E. V., Mironova, L. N. and Zarembo, E. V. (2007). Effect of phytohormones on plant regeneration in callus culture of *Iris ensata*. Thumb Biology Bulletin, 34(5): 446-450.
25-Boltenkov, E. V. and Zarembo, E. V. (2005). *In vitro* regeneration and

callogenesis in tissue culture of floral organs of the genus *Iris.* Biology Bulletin, 32: 138-142.

26- Brainerd, K. E. and Fuchigami, L. H. (1982). Acclimatization of aseptic-lly cultured apple plants to low relative humidity. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 106: 515 - 518.

27- Broom, O. C. and Zimmerman, R. H. (1985). Culture of shoot meristems fruit plant cell culture and somatic cell. Genetics of Plants, 1(14): 111-122.

28- Budiarto, K. (2009).The occurrence of hyperhydricity on Several Carnati-ons (*Dianthus caryophyllus*L.) cultivars during low temperature storage. Biodiversitas, 10(3) :104-107.

29- Calder, P. C. and Grimble, R. F. (2002). Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. Eur. J. Clin. Nutr., 56 (3): S14-S19.

30- Dantu, K. P. and Bhojwani, S. S. (1995). *In vitro* formation and field evaluation of corm-derived plants of *Gladiolus.* Scientia Horticulturae, 61: 115-129.

31- Debergh, P. C.and Zimmerman, R. H. (1991). Micropropagation technol-ogy and application. Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht, the Netherla-nds.

32- Deng, G., Zhang, X., Wang, T., Lin, y. and Chen, X. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Iris pallida* Lam. Chemistry and Industry of Forest Products, 28(3): 7-12.

33-Deng, G., Zhang, H., Xue, H., Chen, S. H. and Chen, X. (2009). Chemical composition and biological activities of essential oil from the rhizomes of *Iris bulleyana*. Agricultural Sciences in China, 8(6): 691-696.

34- Dipti, T., Ghorade, R. B., Swati, M., Pawar, B.V. and Ekta, S . (2005) . Rapid multiplication of Turmeric by micropropagation. Annual Plant Phisiology, 19: 35-37.

35- Dobranszki, J., Abdul-Kader, A., Magyar-Tabori, K., Jambor-Benczur, E., Bubán, T. and Szalai , J. (2000a). *In vitro* shoot multiplication of apple: comparative response of three rootstocks to cytokinins and auxin. Int. J. Horti. Sci., 6: 36-39.

36- Druart, PH., Kevers, C. L., Boxus, P.H. and Gaspar, T. (1982). *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness, effect on endogenous phenols and peroxidases. Z. Pflanzenphysiol.,109: 429-436.

37- Emek,Y. and Erdag, B. (2007). *In vitro* propagation of *Gladiolus anatolicus.* Pak. J. Bot., 39(1): 23-30.

38-Evans, W. C. (2002). Trease and Evans pharmacognosy, 15th ed. W. B. Saunders, Edinburgh, London, New York, p. 37, 417.

39-Farag, S. F., Kimura, Y., Ito, H., Takayasu, J., Tokuda, H. and Hatano, T. (2009). Newisoflavone glycosides from *Iris spuria* L.(Calizona) cultivated in Egypt. J. Nat. Med., 63: 91–95.

40- Faria, R. T. and Illag, R. D. (1995). Micropropagation of *Zingiber spectabile* Griff. Scientia Horticulture, 62: 135-137.

41- Filipowicz, N., Kaminski, M., Kurlenda, J. and Asztemborska, M. (2003). Antibacterial and antifungal activity of *Juniper berry* oil and its selected components. Phytotherapy Research, 17: 227-231.

42- Frank, T., Kavers, C., Gaspar, T., Dommes, J., Deby, C., Greimess, R., Didier, S., and Duspont, G. D. (2004). Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelreite: a controlled stress response. Plant Physiol. Biochem., 42: 519-527.

43-Fred, J. and Chittendeno, S. P. M. (1965). The royal horticultural society dictionary of gardening, a practical and scientific encyclopedia of horticulture, Oxford University Press, England, vol. II.

44-Fujin, M., Fujimura, T. and Hamada, K . (1971). Multiplication of Dutch *Iris* (*Iris hollandica*) by organ culture. J. Japan. Soc. Hort. Sci., 41(1): 66-71.

45- Gaba,V. P. (2005). Plant growth regulators in plant tissue culture and development. In: Trigiano, R. N., Gray, D. J. (Eds). Plant development andbiotechnology CRC Press, Florida, pp 87-96. culture. *In vitro* Cellular and Developmental Biology Plant. 32: 272-289.

46- George, E . F. (1993). Plant propagation by tissue culture. part1. The technology, Exegetics Ltd., Edington, Wilts, UK.

47- George, E. F., Hall, M. A. and De Klerk, G. J. (2008). Plant propagation by tissue culture, 3rd Edition.Volume 1. The background. Exegetics, Basistoke. 501 pp.

48- Goldblatt, P. (2002). "Iridaceae". Flora of north america.Volume 26: Magnoliophyta: Liliidae: Liliales and Orchidales. New York: Oxford University Press. p. 348.

49-Goldblatt, P. and Manning, J. (2008). The *Iris* family: natural history and classification. Portland: Timber Press. ISBN 978-0-88192-897-6.

50- Goussen, H. (1982). Preces de botanique, T.II.vegetaux superieurs 2eme edition massom. Paris, 579 p.

51- Gozu,Y., Yokoyama, M., Nakamura, M., Namba, R., Yomogida, K., Yanagi, M. and Nakamura, S. (1993). *In vitro* propagation of *Iris*

pallid. Plant Cell Reports,13:12-16.

52- Grewel, M. S., Arora, J. S. and Gosal, S. S. (1995). Micropropagation of *Gladiolus* through *In vitro* cormlets production. Plant Tiss. Cult., 5: 27-33.

53- Guvence, A., Kurucu, S., Koyuncu, M., Arihan, O. and Erdurak, C. S. (2005). Investigation on the seeds of *Iris spuria* L. Subsp.musulmanica (fomin) takht. (Iridaceae).Turkish J. Pharm. Sci., 2(3): 125-136.

54- Haissing, B. E. (1986). Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. PP. 141-189. In Jackson M. B. (ed) 1986 (q. v.).

55- Hanawa, F., Tahara, S., Mitzutani, J. (1991). Isoflavonoids produced by *Iris seudacorus* leaves treated with cupric chloride. Phytochemistry, 30: 157-163.

56- Hartamann, H. F., Kester, D. E., Dauies, F. D. J. and Geneve, R. L. (1997). Plant propagation – principles and practices, 6th Ed. Prentice Hall of India Private Ltd., New Delhi, 549-611.

57- Hayes, M. L. and Berkovitz , B. K. (1979). The reduction of fissure caries in wistar rats by a soluble salts of nonanoinic acid . Arch. Oral Boil., 24: 663-666.

58- Heller, R. (1953). Recherches sur la nutrition mineral des tissue vegetaux cultivees *in vitro*. Am. Sci. Nat. Bor. Biol. Veg., 14: 1-233.

59- Henderson, G., Wells, J. D. and Jeanne R. L. (1991). Methyl palmitate and methyl myristate repel flies. Fla. Entomol., 74: 365-368.

60- Hildebrandt, V. and Harney, P. M. (1988). Factors affecting the release of phenolic exudate from explants of *Pelargonium*×*hortorum*, Bailey 'Sprinter Scarlet'. J. Hortic. Sci., 63: 651-657.

61- Hiremath, R. C. (2006). Micropropagation of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). M.Sc (Degree). Department of Horticulture College of Agriculture, Dharwad University of Agricultural Sciences, Dharwad.

62- Hoffmann, D. (1996).The Complete illustrated holistic herbal, Shaftesbury Dorest: Element Books, UK.

63- Hosoki, T. and Tahara, Y. (1993). *In vitro* propagation of *Salvia leucanth.* Cav. Hort. Science, 28: 226.

64- Hussain, I., Muhammad, A., Rashid , H. and Quraishi , A. (2001). *In vitro* multiplication of *Gladiolus.* Plant Tiss. Cult., 11: 121-126.

65-Hussey, G. (1975). Totipotency in tissue culture and callus of some membrance members of the Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae. J. Exp. Bot., 26: 253-262.

66- Hussey, G. (1976). Propagation of Dutch *Iris* by tissue culture. Sci. Hort., 4: 163-165.

67-Ichihashi, S. and Kato, S. (1986). Clonal propagation of *Iris kaempferi* of

flower organ culture. Bull. Aichi. Univ. Education, 35: 135-143.

68- Islam, M. A., Kloppstech, K. and Jacobsen, H. J. (2004). Efficient procedure for *in vitro* micropropagation induction in *curcuma longa* L. a medicinal plant of tropical Asia. Plant Tissue Cult., 14(2): 123-134.

69-Jayaweer, D. M. A. (1981). Medicinal plants. The National Council of Sri-Lanka , Colombo, Sri Lanka, Part III, 79.

70-Jehan, H., Courtois, D., Ehret, C., Lerch, K. and Petiar, V. (1994). Plant regeneration of *Iris pallida* Lam. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers. Plant Cell Reports, 13(12): 671- 675.

71-Jevremovic, S. and Radojevic, L. J. (2006). Establishment of efficient regeneration protocol from leaf explants of *Iris pumila* shoots cultured *in vitro*. Scientia Horticulture, 108: 100-103.

72- Jo, E., Tewari, R. K., Hahn, E. and Paek, K. (2008). Effect of photoperiod and light intensity on *in vitro* propagation of *Alocasia amazonica*. Plant Biotechnology Reports, 2: 207-212.

73- Johnson, S. and Saikia, N. (2009). Fatty acids profile of edible oils and fat in India. Centre for Science and Environment. New Delhi.

74- Jones, O. P. (1985). The role of growth regulators in the propagation *in vitro* (micropropagation) of temperate fruit trees. British Plant Growth Regulator Group, Monograph 13, Growth Regulators in Horticulture, 113-124.

75- Jones, O. P. (1986). Micropropagation of strawberry and temprate fruit tree. Proc. Gnst. Hort. Symp. Univ. Nottingham, School of Agriculture, 85-96.

76- Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J. and Truant, J. P. (1972). Fatty acid and derivatives as antimicrobial agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2(1): 23-28.

77- Kamo, K., Chen , J. and Lawson, R. (1990). The establishment of cell suspension cultures of *Gladiolus* that regenerate plants. *In vitro* Cell Dev. Biol. Plant, 26: 425-430.

78- Kato, A., Ando, K., Tamura, G. and Arima, K. (1971). Effects of some fatty acid esters on the viability and transplantability of ehrlich ascites tumor cells. Cancer Res., 31: 501-504.

79- Kaushal, N., Modgil, M., Thakur, M., Sharma, D. R. (2005). *In vitro* Clonal multiplication of an apple rootstock by culture of shoot apices and axillary buds. Indian J. Exp. Biol., 43: 561-565.

80-Kawase, K., Mizutani, H., Yoshioka, M. and Fukuda, S. (1995). Shoot formation on floral organs of Japanese *Iris in vitro*. J. Japan. Soc. Hort. Sci., 64 (1): 143- 148.
81-Keresa, S., Mihovilovic, A., Curkovic-Peica,M., Mitic, B., Baric, M., Vrsek, I. and Marchetti, S. (2009). *In vitro* regeneration of the Croatian endemic species *Iris adriatica* trinajstic ex mittic. ACTA Biologica cracoviensia Series Botanica, 51(2): 7-12.
82- Khaleghi, A., Khalighi, A., Sahraroo, A., Karimi, M., Rasoulnia, A., Ghafoori, I. N. and Ataei, R. (2008). *In vitro* Propagation of *Alstroemeria* cv. 'Fuego'. American-Eurasian J. Agricult. Environ. Sci., 3: 492-497.
83- Kim, Y. S., Hahn, E. J., Yeung, E. and Paek, K. Y. (2003). Lateral root development and saponin accumulation as affected by IBA or NAA in adventitious root cultures of *Panax ginseng* CA Meyer. *In Vitro* Cell. Develop. Biol., 39: 245-249.
84- Koetle, M. J. (2009). *In vitro* propagation of *Dierama erectum.* Research Centre for Plant Growth and Development School of Biological and Conservation Sciences, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg. 86 pages.
85-Kristiansen, K., Ornstrup, H. and Brandt, K. (1999). *In vitro* PPFD and media composition affect both in and *ex vitro* performance of *Alstroemeria* Butterfly-hybrids.Plant Cell, Tissue and Organ Cult., 56: 145-153.
86- Kromer, K. D. (1985). Regeneration of some monocotyledonous plants from subterranean organs *in vitro*. Acta Agrobotanica, 38: 65-87.
87-Kyte, L. and Kleyn, J. (1996). Plant from test tubes – An introduction to micropropagation, 3rd edn, Timber Press, Portland.
88- Laublin, G. and Cappadocia, M. (1992). *In vitro* ovary culture of some apogon garden Irises (*I. pseudacorus* L., *I. setosa* Pall. and *I. versicolor* L.). Botanica Acta., 105: 319–322.
89-Laublin, G., Saini, H. S., Cappadocia, M. (1991). *In vitro* plant regeneration via somatic embryogenesis from root culture of some rhizomatous Irises. Plant. Cell. Tissue. Organ. Cult., 27: 15-21.
90- Leng, P., Su, S., Wei, F., Yi, F. and Duan, Y. (2009). Correlation between browning, total phenolic content, polyphenol oxidase and several antioxidation enzymes during pistachio tissue culture. Acta Hortic., 829: 127-131.
91- Lin, J., Puckree, T. and Mvelose, T. P. (2002). Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. Journal of Ethanopharmacology, 79: 53–56.
92- Linington, I. M. (1991). *In vitro* propagation of *Dipterocarpus intricatus*.

Plant Cell Tissue Org. Cult., 27: 81-88.

93- Loc, N. H., Duc, D. T., Kwon, T. H. and Yang, M. S. (2005). Micropropagation of Zedoary (*Curcuma zedoaria* Roscoe) a valuable medicinal plant. Plant Cell Tissue Org. Cult., 81: 119-122.

94- Maene, D. (1986). La multiplication *in vitro* des especes ornamental , in: les techniques de propagation des especes ligneuses non resineuses gembloux. 15-17.

95- Maene, L. and Debergh, P. C. (1983). Rooting of tissue culture plants under *in vivo* conditions. Acta Horticulture, 212: 335-348.

96-Malmug, J. J. F., Inden, H. and Asahiva, T. (1991). Plantlet regeneration and propagation from Ginger callus. Scientia Horticulture, 48: 89-97.

97-Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Shakir, C. and Seghal Kiran, G. (2009). Antibacterial activity of *Falkenbergia hillebrandii* (Born) from the Indian coast against human pathogens. International Journal of Experimental Botany, 87: 161-166.

98-Manning, J. (2004). "Iridaceae" South African National Biodiversity Institute. http://www.plantzafrica.com/planthij/iridaceae.htm. Retrieved 2009- 05- 12.

99- Mathew, B. (1989). The *Iris*. Oregon Timber Press, Portland, Oreg. 326 pp.

100- McAlister, B. G., Jager, A. K. and VanStaden, J. (1998). Micropropagation of *Babiana* spp. South African Journal of Botany, 64: 88-90.

101- McFarlane, J. E. (1968). Fatty acids, methyl esters and insect growth. Comp. Biochem. Physiol., 24: 377-384.

102- McGaw, L. J., Jager, A. K. and VanStaden. J. (2002). Isolation of antibacterial fatty acids from *Schotia brachypetala*. Fitoterapia, 73(5): 431-433.

103- Meenakshi, N., Sulikeri, G. S., Krishnamoorthy,V. and Ramakrishna,V. H. (2001). Standardization of chemical environment for multi shoot induction of Turmeric (*Curuma longa* L) for *in vitro* clonal propagation. Crop Research, 22: 449-453.

104- Meyer, M. M., Fuchigami, L. H and Roberts, A. N. (1975). Propagation of tall bearded Irises by tissue culture. Hort. Science, 10: 479-480.

105- Meyer, H. j. and VanStaden, J. (1988*). In vitro* culture of *Geigeria aspera* Harv. Plant Cell. Tiss and Org. Cult., 5: 205-211.

106-Mielke, K. A. and Anderson, W. C. (1989). *In vitro* bulblet formation in Dutch Irises. Hort. Science, 24: 1028-1031.

107- Miyake,Y., Ito, H. and Yoshida, T. (1997) . Identification of iridals

aspiscicidal components of iridaceous plants and their conformations associated with CD spectra. Can. J. Chem., 75: 734-741.

108- Moncousin, C. H. (1986). Biochemical events in mono- nodal stem Cuttings of *Vitis* hybrid during *in vitro* adventitious rooting. p.148 in Somers *et al* (eds). (1986). (q. v.).
109- Morini, S., Trinci, M., and Zacchini, M. (1991). Effect of different phot-operiods on *in vitro* growth of Mr. S.2/5 plum rootstock. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 25: 141-145.
110-Moutrde, P. (1966). Nouvelle flore du Liban et de la Syrie. Edition: Del, Impri. Catholique. Beyrouth., Liban.
111- Moutrde, P. (1980). Nouvelle flore du Liban et de la Syrie. 2eme Tomes Dar El Mashreq, Beyrouth, Liban.
112- Moutrde, P. (1983). Nouvelle flore du Liban et de la Syrie. 3eme tome + Atlas, Dar ElMashreq, Beyrouth, Liban.
113- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. physiol. Plant., 15: 473-497.
114- Nalina,T. and Rahim, Z. H. A. (2007). The crude aqueous extract of *Pipe betle* L. and its antibacterial effect towards *Streptococcus mutans.* American Journal of Biotechnology and Biochemistry, 3(1): 10-15.
115- Nazir, N., Koul, S., Qurishi, M. A., Taneja, S. C., Ahmad, S. F., Khan, B., Bani, S. and Qazi, G. N. (2009). Immunomodulatory activity of Isoflavones isolated from *Iris germanica* (Iridaceae) on T-lymphocytes and cytokines. Phototherapy Research, 23(3) : 428-433.
116- Nhut, D. T., Van Le, B., Tanaka, M. and Thanh Van, K. T. (2001). Shoot induction and plant regeneration from receptacle tissue of *Lillium longiflorum*. Sci. Hort., 87: 131-138.
117- Norton, M. E. and Norton, C. R. (1986). Change in shoot proliferation with repeated *in vitro* subculture of shoots of woody species of Rosaceae . Plant cell, tissue and organ culture, 5(3): 187-197.
118- Onay, A. and Jeffree, C. E. (2000). Somatic embryogenesisin pistachio (*Pistacia vera* L.). In: Jain SM,Gupta PK, Newton RJ, editors. Somatic embryogenesis in woody plants,vol. 6. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 361- 390.
119- Pan, M. J. and Van Staden, J. (1998).The use of charcoal in *in vitro* culture a review. Plant Growth Regul., 26: 155-163.
120- Parang, k., Knaus, E. E., Wiebe, L. L., Sardari, S., Daneshtalab, M. and Csizmadia, F. (1996). Synthesis and antifungal activities of myristic acid analogs. Chemistry in Life Sciences, 329(11): 475-482.
121- Parra, R. and Amo-Marco, J. B. (1996). Effect of plant growth regulators

and basal media on *in vitro* shoot proliferation and rooting of *Myrtus communis* L. Biologia plant., 38(2): 161-168.

122- Pelkonen, V. P. (2005). Biotechnological approaches in Lily (*Lilium*) production. Faculty Science, Department of Biology University of Oulu Finland. ISSN, 0355-3191.

123- Petschow, B. W., Batema, R. P. and Ford, L. L. (1996). Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium -chain monoglycerides and fatty acids. Antimicrob. Agents Chemother., 40: 302-306.

124- Pierik, R. L. M. (1987). *In vitro* Propagation of Malling Merton apple rootstocks. Hort. Science, 15(5): 597-598.

125- Pierik, R. L. M., Van Voorst, A., Boody, G., Van Acker, C. A. M., Lelivelt, C. L. C. and De Wit, J. C. (1997). Vegetative propagation of *Alstroemeria* Hybrids *in vitro*. Acta Hort., 226: 143-147.

126- Poonsapaya, P., Praisintu, K., palevitch, D. and Puteusky, E. (1993). Micropropagation of *Zingiber cassumunar* roxb. Acta Horticulture, 344: 564-577.

127-Post, G. (1934). Flora of Syria, Palastine and Sinai. Vol 1: 2, Second Edition. American Press, Beirut, Lebanon.

128- Quoirin, M. and Lepoivre, P. (1977). Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp. Acta Hortic., 78: 437- 442.

129- Radionenko, G. I. (1987). The genus *Iris* ,question of morphology, biology evalution and systematic. British *Iris* Society, London, 222 pp.

130- Radojevic, L., Sokic, O. and Tucic, B. (1987) . Somatic embryogenesis in tissue culture of *Iris* (*Iris pumila* L.). Acta. Hort., 212: 719 -723.

131-Radojevic, L. and Subotic, A. (1992). Plant Regeneration of *Iris setosa* Pall through somatic embryogenesis and organogenesis. J. Plant Physiol., 139: 690- 696.

132-Radwan, M. A. and Aboul-Enein, H. Y. (2002). The effect of various oral absorption enhancers on the *in vivo* performance of insulin-loaded poly (ethylcyanoacrylate) nanospheres in diabetic rat microencapsul. 19: 225–235.

133- Rahmann, A., Nasim, S., Baig, I., Jalil, S., Orhan, I., Sener, B. and Choudhary, M. I. (2003). Anti-inflammatory isoflavonoids from the rhizomes of *Iris germanica*. J. Ethnopharmacol., 86: 177–180.

134- Ramanand, M. L., Singh, S. B. and Singh,V. P. (2007).Optimization of rooting in micropropagated shoots of sugarcane. Sugar Tech., 9(1): 95-97.

135- Ramanayake, S. M. S. D., Meemaduma,V. N. and Weerawardene, T. E. (2006). *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the

large scal production of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* 'Striata'). Scientia Horti., 110: 109 -113.

136- Ranjan, R., Purohit, S. S. and Prasad, V. (2003). Plant hormones: action and application, Agrobios (India).
137- Reuther, G. (1977). Embryoide differenzierungsmuster im kallusder Gattungen *Iris* and asparagus. Ber. Deutsh. Bot. Ges., 90: 417- 437.
138- Rihakova, Z., Filip,V., Smidrkal, J. (2001a). Antifungal effectiveness of glycerol esters with lauric acid and its dependency on their purity. Adv. Food Sci., 23: 57- 62.
139- Roberts, A.V., Walker, S., Horan, I., Smith, E. F. and Mottley, J. (1992). The effect of growth retardants, humidity and lighting at Stage III on Stage IV of micropropagation in *chrysanthemum* and rose. Acta Hortic., 319: 153-158.
140- Rossignol, M., Santoni, V., Szponrski, W. and Vansuyts, G. (1990). Differential sensitivity to auxin at the plasma membrane level. pp 498-503 in Nigkamp *et al*., (eds) 1990 (q. v.).
141-Rouse, M., Rotger, M., Piper, K., Steckelbeng, J., Scholz, M., Andrews, J. and Patel, R. (2005). *In vitro* and *in vivo* evaluations of the activities of lauric acid monoester formulations against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother., 49: 3187- 3191.
142- Sanghamitra, N. (2000). *In vitro* multiplication and microrhizome induction in *Cucurma aromatica* Sallsb. Plant Growth Regulation, 32: 41-42.
143- Saravanakumar, D. E. M., Folb, P. I., Campbell, B. W. and Smith, P. (2008). Antimycobacterial activity of the red alga *Polysiphonia virgata*. Pharm. Biol., 46: 254-260.
144-Seidel, V. and Taylor, P. W. (2004). *In vitro* activity of extracts and constituents of *Pelagonium* against rapidly growing mycobacteria. Antimic., 23: 613- 619.
145-Seki, K., Tomihari, T., Haga, K. and Kaneko, R. (1994). Iristectorene B, a monocyclictriterpene ester from *Iris tectorum*. Phytochemistry, 36: 433-438.
146-Shibli, R. A. and Ajlouni, M. M. (2000). Somatic embryogenesis in the endemic Black *Iris*. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 61: 15–21.
147-Shimizu, K., Nagaike, H., Yabuya, T. and Adachi, T. (1997). Plant regeneration from suspension culture of *Iris germanica.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 50(1): 27-31.
148- Shimizu, K., Yabuya, T., Adachi, T. (1996). Plant regeneration from protoplasts of *Iris germanica* L. Euphytica, 89: 223–227.
149-Shu, P., Hong, J. L., Wu, G., Yu, B. Y. and Qin, M. J. (2010). Analysis of flavonoids and phenolic acids in *Iris tectorum* by HPLC-DAD-ESI-MS. Chin. Journal of Natural Medicine, 8(3): 202-207.

150- Squirs, W. M., Langton, F. A., and Fenewloveon, J. S.(1991). Factors influencing the transplantation success of micropropagated *Narcissus* bulbils. J. Hort. Science, 66: 661- 671.
151- Sreelatha, U., Nair, R. S. And Rajmohan, K. (1998). Factors affecting somatic organogenesis from leaf explants of *Anthurium* species. Journal of Ornamental Horticulture, 1: 48-54.
152- Srivastava, L. M. (2002). Plant growth and development: hormones and environment. Academic Press, London.
153- Steven, M. and Anderson, M. (2003). Douglas *Iris* (*Iris douglasiana)*, USDA-NRCS, National Plant Data Center.
154-Stoltz, L. P. (1977). Growth regulator effects on growth and development of excised mature *Iris* embryos *in vitro*. Hort. Science, 12: 495-497.
155- Su, B. N., Takaishi, Y., Honda, G., Itoh, M., Takeda,Y. and Kodzhimato, O.K. (2000). Sesquiterpene phenylpropanoid and sesquiterpene chromone derivatives from *Ferula pallida*. J. Nat. Prod., 63: 520–522.
156- Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. Biotechnol. Adv., 26: 618-631.
157- Thomas, P. and Ravindra, M. B. (1997). Effect of pruning or removal of *in vitro* formed roots on *ex vitro* root regeneration and growth in micropropagation graps. Plant Cell, Tissue and Organ cult., 51: 177-180.
158- Thrope, T. (1981). Plant tissue culture : method and application in agriculture, New York, Academic Press.
159-Van der Linde, P. C. G. and Hol, G. M. G. M. (1988). Tissue culture of *Iris.* Propagation is much improved. Bioembollen., 99: 36-37.
160-Van der Lind, P. C. G. and Hol, G. M. G. M., Blom- Barnhoorn, G. J., Van AartrijkJ. and Klerk, G. J. (1988). *In vitro* propagation of *Iris hollandica* tub. cv. prof. blaauw. regeneration on bulb –scale explants. Acta. Hort., 226: 121- 128**.**
161- Van Waes, J. (1987). Effect of activated charcoal on *in vitro* propagation of Western European Orchids. Acta Horticulture, 212: 131-138.
162- Vardja, R. and Vardja, T. (2001). The effect of cytokinin type and concentration on the multiplication rate of some decorative plants. Proc. Estonian. Acad. Sci. Bio. Ecol., 50: 22-32.
163- Vieitez, M. A. and Vieitez, M. L. (1983). Castanea sativus plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*.Scientia horticulture, 18(4): 343-351.
164-Villamor, C. C. (2010). Influence of media strength and sources of

nitrogen on micropropagation of Ginger, *Zingiber officinal* Rosc. International Scientific Research Journal, 2(2): 150-155.

165- Villamor, E., Koulinska, I. N., Furtado, J., Baylin, A., Aboud, S., Manji, K., Campos, H. and Fawzi, W. W. (2007). American Journal of Clinical Nutrition, 86(3): 682-689.

166- Vuylsteke, D. R. (1989). Shoot tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa germplasm*. Practical Manuals for Handling Crop Germplasm *In Vitro* 2. Rome,International Board for Plant Genetic Resources.

167-Wang, W. C., Nguyen, H. T. (1990). A novel approach for efficient plant regeneration from long-term suspension culture of wheat. Plant Cell Rep., 8: 639- 642.

168- Wang, Q., Tang, H., Quan, Y. and Zhou, G. (1994). Phenol induced browning and establishment of shoot tip explants of 'Fuji' apple and 'Jinhua' pear cultured *in vitro*. J. Hortic. Sci., 69: 833–839.

169- Wang, Y., Jeknic, Z., Ernst, R. C. and Chen, T. H. H. (1999a). Efficient plant regeneration from suspension- cultured cell of tall bearded *Iris* . Hort. Science, 34(4): 730-735.

170- Wang, Y., Jeknic, Z., Ernst, R. C. and Chen, T. H. H. (1999 b).Improved Plant regeneration from suspension-cultured cell of *Iris germanica* L. "Skating Party". Hort. Science, 34: 1271-1276.

171- Wang,Y. N., Wang, H. X., Shen, Z. J., Zhao, L. L., Clarke, S. R., Sun, J. H., Du, Y. Y. and Shi, G. L. (2009). Methyl palmitate, an acaricidal compound occurring in greenwalnut husks. J. Econ. Entomol., 102(1): 196-202.

172- Waters, T. (2011). Cultivation of aril and arilbred Irises. American Society of *Iris, Iris encyclopedia*.

173- Werner, E. M. and Boe, A. A. (1980). *In vitro* propagation of Malling apple rootstock. Hort. Science, 15: 509-510.

174-Weymouth and Chandary. (1975). *Iris damascene*, Botanistica Notisier, vol.128.

175-Yabuya, T., Ikeda, Y. and Adachi, T. (1991). *In vitro* propagation of Japanese garden *Iris ensata* Thunb. Euphytica, 57: 77-81.

176- Yang, D., Pornpattananangkul, D., Nakatsuji, T., Chan, M., Carson, D., Huang, C. M. and Zhang, L. (2009). The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes*. Biomaterials, 30: 6035–6040.

177-Yeong, L. H., Nancy, K. G. and Micheal, W. P.(1989). Newly recognized

nticarcinogenic fatty acids: identification and quantification in natural and processed cheeses. J. Agric. Food Chem., 37: 75-81.

178- Yepes, L. M. and Aldwinckle, H. S. (1994). Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. Plant Growth Regul., 15: 55–67.

179-Yildirim, E. (2007). Development of *in vitro* micropropagation technique for Safforon (*Crocus sativus* L.). The degree of master of science in biology, Middle East Technical University, 76 pages.

180-Yu, X. F., Zhang, H. Q., Yann, M. and Zhou, Y. H. (2009). Karyotype studies on ten *Iris* species (Iridaceae) from Sichuan, China,Caryologia. 62(3): 253-260.

181- Zaid, A. (1984). *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to Date palm cultures. Date Palm Jour., 3(1): 269-275.

182- Zhang, Q. X., Wang, Q. L., and Han, J. H. (1995). Effect of fatty oil in *Periploca sepium* on neural system in mice. Xi'an Med.Univ., 16: 43-44.

183- Ziv, M. (1986). *In vitro* hardening and acclimation of tissue culture plants. In: Withers, L. A., Alderson, P. G. (ed.): Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications.

184- Ziv, M. (1989). Morphogenic patterns of plants micropropagated in liquid medium in shaken flasks or large-scale bioreactor cultures. 40: 145-153.

185- Ziv, M. and Lilien-Kipnis, H. (2000). Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes *in vitro*. Plant Cell Reports, 19: 845-850.

Abstract

wild *Iris* species found in Syria are characterized by special, beautiful form and have a great importance in applied studies for genetic biodiversity . *Iris* plants respond poorly to propagation by seeds, and is rarely found in nature therefore , a new trend has evolved to propagate these species through tissue culture technique to preserve it from deterioration and to study the possibility to use them as a medical or ornamental plant.

In this investigation, a technique has been established, for the first time in Syria for vegetative micropropagation of *Iris nigricans* and *Iris aurantica*. Some growth hormones and growing media were experienced to determine the best conditions in multiplication and rooting stages. In addition, chemical analysis of essential oil by gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS) were applied.

Bases of leaves and shoot tips of rhizomes (after surface disinfection by chlorox 3%) were cultured on solidified MS medium containing 30 g/l sucrose supplied with 2 mg/l BAP, and 0.2 mg/l IBA.

Results showed, after one month of culture, that using shoot tips of rhizomes resulted in the highest growth percentage (35.76 %) in initial stage , with significant differences comparing with base of leaves explants. meanwhile, no significant differences were recorded between species (*I.nigricans and I.aurantica*).

In the multiplication stage, MS media resulted in the highest multiplication rate and shoot length with significant difference compared with Heller media. The concentration of 5 mg/l of BAP achieved the highest average (13.36) and good shoot length (4.73 cm) in *Iris nigricans*, but in *Iris aurantica* the concentration 3 mg/l of BAP resulted in highest multiplication rate (٣.٤٣) with significant difference compared with the control (١.٢٥) .

Subculture of the plantlets on the same medium resulted in increasing multiplication rate and shoot length for the two species *(I. nigricans* and *I.aurantica*).

In rooting stage, results showed that *Iris nigricans* produced the highest root percentage (81.72 %) with significant difference compared to *Iris aurantica* (66.44 %) . The highest root percentage (89.25%) was observed when using the concentration 3 mg/l of IBA.

Results of root number showed no significant difference between the two species of *Iris*. The highest root number (3.57) was recorded when using the concentration 3 mg/l IBA with significant difference compared with the control (1.09), meanwhile, the control resulted in the highest root length (4.77 cm).

Observation indicated that 100 % of rooted plantlets were successfully acclimatized and developed into plant after one month of transferring them to pots in *Iris nigricans* . meanwhile, percentage of success was 86.95% in *Iris aurantica.* plantlets were cultured in greenhouse to study their development in the natural conditions.

Essential oil from rhizomes of *Iris* species were analyzed by GC-MS . The results showed that : 23 volatile components were identified and determined in the oil of the rhizomes in *Iris germanica,* 18 *in Iris nigricans* and 19 chemicals in *Iris aurantica*.

Myristic acid was detected as the main fatty acid in the oil from all species , it was 61.42 % in *Iris germanica*, 80.33 % in *Iris nigricans* and 70.67 % in *Iris aurantica*. The other compounds were Dodecanoic acid , Decanoic acid, Hexadecanoic acid methyl ester ، 9-Octadecenoic acid methyl ester